

Antikörperreifung in der frühen HIV-Infektion und ihre Anwendung in Inzidenztesten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl. Biologe Stephan Loschen,
geboren am 07.04.1977 in Bückeburg**

Präsident der Humboldt-Universität Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christopher Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Herr Prof. Detlev H. Krüger

2. Herr Prof. Georg Pauli

3. Frau PD Dr. Barbara Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 HIV	10
1.1.1 Herkunft und Diversität	10
1.1.2 Morphologie und Genomstruktur von HIV-1	11
1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1	13
1.2 Verlauf der HIV-Infektion	16
1.2.1 Die akute Infektion	16
1.2.2 Die chronische Phase der Infektion	17
1.2.3 Das AIDS-Stadium	19
1.3 Diagnostik von HIV-Infektionen	19
1.4 Therapie	21
1.5 Die Immunantwort gegen HIV	22
1.5.1 Die zelluläre Immunabwehr	22
1.5.2 Die humorale Immunabwehr	23
1.6 Aktuelle Probleme der HIV-Epidemiologie in Deutschland	24
1.7 Methoden zur Inzidenzbestimmung	26
1.7.1 Longitudinale Studien	26
1.7.2 Rückrechnung anhand der AIDS-Fallzahlen	27
1.7.3 Akut-Syndrom	27
1.7.4 HIV-RNA oder p24-Nachweis bei Antikörper-negativen Patienten	28
1.7.5 Nach-Serokonversionsteste	28
1.7.6 Serologischer Test Algorithmus für frische HIV-Infektionen	29
1.7.7 BED-ELISA	30
1.7.8 IDE-V3-ELISA	31
1.7.9 Inno-Lia	31
1.7.10 Anti-p24 IgG3-Antikörper	31
1.7.11 Aviditäts-Methode	32
1.7.12 Verwendung von Filter-getrocknetem Material für Studien	33
1.8 Aufgabenstellung	34

2	Material und Methoden	35
2.1	<i>Material</i>	35
2.2	<i>Studienkollektiv</i>	40
2.2.1	Pilotstudie	40
2.2.2	Kommerzielles Probenpanel	41
2.2.3	Verwendeter Konzentrationsstandard	41
2.3	<i>Serologische Methoden</i>	41
2.3.1	Probenaufarbeitung und Lagerung	41
2.3.2	Anfertigung der Filterproben	42
2.3.3	HIV-1-ELISA	42
2.3.4	BED-ELISA	42
2.3.5	Aviditäts-Index	42
2.3.6	p24-Antigentest	43
2.3.7	Peptid-ELISA	43
2.3.8	Immunoblot-Analysen mit dem HIV Blot 2.2	45
2.3.9	IDE-V3-ELISA	45
2.3.10	IgG-Subklassen Bestimmung	46
2.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	46
2.4.1	RNA-Extraktion	46
2.4.2	Transformation ultrakompetenter <i>E. coli</i> XL10-Gold	46
2.4.3	Plasmidisolierung	47
2.4.4	Restriktionsanalyse des pNL4-3	47
2.4.5	Synthese von cDNA aus RNA	47
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion	47
2.4.7	Agarose-DNA-Gelelektrophorese	48
2.4.8	Quantitative Real-time PCR (TaqMan)	48
2.4.9	Sequenzanalyse	48
2.5	<i>Zellbiologische Methoden</i>	49
2.5.1	Kultivierung eukaryonter Zelllinien	49
2.5.2	Virusherstellung und Vermehrung	49
2.5.3	Virustitration	50
2.5.4	Messung des Zellwachstums mit/ohne Filtereluate	51
2.5.5	Bestimmung der HIV-Infektiosität nach Filtertrocknung	51
2.5.6	Neutralisationstest	52
2.6	<i>Statistik</i>	53
3	Ergebnisse	56

3.1	<i>Etablierung der HIV-Inzidenz-Teste</i>	56
3.1.1	Charakteristika des Referenzprobenpanels	56
3.1.2	Sensitivität und Spezifität des BED-ELISA	57
3.1.3	Sensitivität und Spezifität der Aviditäts-Methode	60
3.1.4	Vergleich der Sensitivität und Spezifität im BED-ELISA und Aviditäts-Index	62
3.1.5	Sensitivität und Spezifität des IDE-V3-ELISA	63
3.2	<i>Charakterisierung der falsch-klassifizierten Proben</i>	65
3.2.1	Wirtsdeterminanten	66
3.2.2	Virale Determinanten	75
3.3	<i>Ergebnisse der Berliner HIV-Inzidenz-Pilotstudie</i>	77
3.3.1	Studienpopulation der Pilotstudie	77
3.3.2	Epidemiologische Untersuchungen	78
3.4	<i>Untersuchungen zu Filter-getrockneten Proben</i>	81
3.4.1	Infektiosität von auf Filter getropften HIV	81
3.4.2	Antikörpernachweis im HIV-ELISA und Western Blot aus Filter-getrocknetem Plasma	82
3.4.3	Inzidenz-Teste aus Filtermaterial	83
3.4.4	RNA Nachweis aus Filtermaterial	85
4	<i>Diskussion</i>	88
4.1	<i>Vergleichbarkeit der HIV-Inzidenz-Teste</i>	88
4.2	<i>Welche weiteren Faktoren können zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Inzidenzteste beitragen?</i>	93
4.3	<i>Einsatz Filter-getrockneter Plasmaproben für Antikörper- und Genomnachweis in Studien</i>	96
4.4	<i>HIV-Pilot-Inzidenzstudie in Berlin</i>	98
4.5	<i>Ausblick</i>	101
5	<i>Literaturangaben</i>	104
	Danksagung	115
	Eidesstattliche Erklärung	116

Zusammenfassung

Da die Inzidenz von HIV-Infektionen das epidemiologische Geschehen am besten widerspiegelt, ist die Kenntnis der HIV-Inzidenz für die epidemiologische Überwachung besonders wichtig. In Deutschland erfolgt die Meldung neu diagnostizierter HIV-Infektionen, die anhand serologischer Antikörperteste identifiziert wurden, nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG). Diese Tests können allerdings frische Infektionen (inzident) nicht von länger zurückliegenden (prävalent) unterscheiden.

In dieser Arbeit wurden anhand eines Probenpanels von Serokonvertern mit sehr gut dokumentierten Infektionszeitpunkten zwei serologische Tests zur Unterscheidung inzidenter und prävalenter Proben am Robert Koch-Institut etabliert und validiert. Beide Tests basieren auf der Reifung des Immunsystems in der frühen HIV-Infektion zur Unterscheidung zwischen einer inzidenten und einer prävalenten Infektion.

Im BED-ELISA werden anhand von anti-HIV-gp41-spezifischen IgG-Antikörperspiegeln die Proben klassifiziert. Die Aviditäts-Methode unterscheidet die Bindungsfähigkeit der Antikörper (Avidität) an spezifische Antigene in Gegenwart eines denaturierenden Agens. Das Probenpanel wurde in einem weiteren Inzidenztest, dem IDE-V3-ELISA, gemessen (Kooperation F. Barin). Dieser Test nutzt ebenfalls den Anstieg der Antikörperreaktivität gegen zwei verschiedene immundominante Epitope.

Wirtsspezifische Marker und virale Eigenschaften wurden untersucht, um Merkmale zu identifizieren, welche die Sensitivität und Spezifität von Inzidenztesten verbessern könnten. Es wurde analysiert, ob Viruslast, CD4⁺-Zellzahl, IgG-Gehalt, IgG-Subklassen oder die Avidität der Antikörper gegen verschiedene HIV-Antigene und Peptide mit der Fehlklassifikation von Proben korrelierten. Auch die Variabilität des viralen Hüllproteins gp41 wurde analysiert. Nach Etablierung und Validierung der Inzidenztests wurde eine Pilotstudie unter Berliner HIV-Patienten durchgeführt. Zur Vereinfachung des Probenverkehrs in Studien wurde der Einfluss einer Filtertrocknung der Plasmaproben auf die Infektiosität von HIV, Stabilität der HIV-RNA und die Antikörperreaktivität im BED-ELISA untersucht.

Im BED-ELISA wurden inzidente Plasmaproben von Patienten, die kürzer als 20 Wochen infiziert waren, mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 86% richtig klassifiziert. Für die Aviditäts-Methode wurde eine Sensitivität von 74% und eine Spezifität von 82% ermittelt. Im IDE-V3-ELISA ergab sich eine Sensitivität von 73% und eine Spezifität von 84%. Von allen untersuchten wirtsspezifischen Faktoren korrelierte nur der Gehalt an Antikörpern der IgG3-Subklasse mit der Fehlklassifikation der Proben.

Von den 83 prävalenten Proben (nach über 20 Wochen Infektionsdauer entnommen) wiesen die 71 im BED-ELISA richtig-prävalent bestimmten Proben einen signifikant höheren IgG3-Gehalt gegenüber den 12 durch den BED-ELISA falsch-inzident bestimmten Proben auf.

Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse, des aber kostengünstigeren und praktischeren Testformates, wurde der BED-ELISA für die Durchführung der Pilotstudie eingesetzt. Hierfür wurden zwischen Februar 2005 und November 2007 von 132 erstmalig HIV-1 positiv diagnostizierten Patienten Proben genommen und im BED-ELISA analysiert.

Die Pilotstudie war für Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), mit 90% Anteil der Gesamt-Studienpopulation repräsentativ. Der Anteil inzidenter Infektionen unter Berliner HIV-Erstdiagnosen war im Vergleich zu anderen publizierten Studien mit 51% sehr hoch. Der Anteil inzidenter Infektionen war in der Altersgruppe von 19-24 Jahren besonders hoch. Es konnte gezeigt werden, dass durch die erhobenen soziodemografischen Daten spezielle Risikogruppen und Risikoverhalten identifiziert werden können.

Anhand Filter-getrockneter Plasmaproben konnte gezeigt werden, dass das HIV nach Trocknung nicht mehr infektiös war. Die Antikörperreaktivitäten blieben jedoch bei der Filtertrocknung erhalten. Zum sensitiven RNA-Nachweis und für die genotypische Resistenztestung aus RNA müssen die Filterproben jedoch nach Trocknung bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde eine deutschlandweite Inzidenzstudie mit Filter-getrockneten Plasmaproben geplant, die seit Januar 2008 im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit zur Verbesserung der Datenlage zur HIV-Inzidenz in Deutschland durchgeführt wird.

Abstract

As the incidence of HIV infection is the best indicator of the epidemiological situation, this factor is especially important for epidemiological monitoring. HIV/AIDS surveillance in Germany is based on mandatory anonymous reporting of newly diagnosed HIV infections identified by serological methods ("Infektionsschutzgesetz", IfSG). These tests cannot differentiate between recent (incident) and chronic (prevalent) infections.

In this PhD thesis two methods that can differentiate between incident and prevalent infections were established at the Robert Koch-Institute and validated with a panel of samples from seroconverters with a very well defined date of infection. Both tests are based on the maturation of the immune system during early HIV-infection.

The BED-ELISA uses anti-HIV-gp41 specific IgG-antibody levels for differentiation. The avidity method is based on the binding-capacity (avidity) of the antibodies to specific antigens in the presence of a chaotropic agent. The sample panel was also evaluated using an additional incidence ELISA, the IDE-V3-ELISA (cooperation with F. Barin). This test is also based on the antibody's reactivity to two different immune dominant epitopes, allowing incident and prevalent infections to be differentiated.

Host specific factors and viral determinants were analysed to provide information that could lead to improvements in the sensitivity and specificity of the incidence tests. Viral loads, CD4⁺ cell counts, IgG titres, IgG subclasses and avidities of antibodies with different antigens and peptides were determined. Furthermore, the degree of variability within the *env*-gp41 was measured. After establishing and validating the methods, a pilot study with HIV-infected patients in Berlin was carried out. The inactivation of HIV-1 after filter-drying of samples, the stability of viral RNA and reactivity of antibodies in the BED-ELISA were analysed to simplify the transport of samples in future studies.

Using the BED-ELISA, incident plasma samples from patients infected for less than 20 weeks were identified correctly with a sensitivity of 80% and a specificity of 86%. The avidity method showed a sensitivity of 74% and a specificity of 82%, whereas the IDE-V3-ELISA showed a sensitivity of 73% and a specificity of 84%. Of all host factors analysed, only the titre of IgG3-antibodies correlated with the incorrect classification of samples.

From the 83 prevalent samples (samples taken after 20 weeks of infection) the 71 correctly classified as prevalent samples by BED-ELISA showed a significantly higher IgG3 content compared to the 12 incorrectly identified as incident samples.

Because it gave comparable results but was more cost-effective and easier to handle, the BED-ELISA was used for the pilot-study. Samples from 132 newly diagnosed HIV-positive patients were obtained between February 2005 and November 2007 and analysed in the BED-ELISA. The proportion of samples from men who have sex with men (MSM) was 90%, which is representative of the complete study population. The proportion of incident infections (51%), occurring predominantly in the 19-24 year age group, was very high compared to that reported in other studies. Based on social-demographic data it was possible to identify special risk-groups and risk-behaviours.

It could be shown that filter-drying of plasma samples rendered HIV non-infectious but did not influence antibody reactivity. However, to ensure stability of the viral RNA (needed for viral load measurements and genotypic analyses of drug resistance) it was necessary to store the dried filters at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Based on these results, a German HIV incidence study using filter-dried plasma samples, designed to improve knowledge of HIV-incidence in Germany, was sponsored by the German Federal Ministry of Health and has been ongoing since January 2008.

Schlagwörter:

HIV-1, Inzidenz-Assays, BED-ELISA, Avidität

Keywords:

HIV-1, Incidence-Assays, BED-CEIA, Avidity

Abkürzungsverzeichnis

AI	Aviditäts-Index
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
APC	Antigen-präsentierende Zellen
AS	Aminosäure(n)
BED-ELISA	BED-IgG-capture ELISA
BHQ	Black-Hole-Quencher
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR5	chemokine cc-motif receptor 5
CD	cluster of differentiation
CPE	zytopathischer Effekt
CTL	zytotoxischen T-Zellen
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DC-SIGN	dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin
ddntp	Didesoxynukleotid
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten
ELSA	enzym linked immunoabsorbent assay
Env	Hüllglykoproteinkomplexe/Hüllproteine
FI	falsch-inzident
FKS	fötales Kälberserum
FP	falsch-prävalent
gag	gruppen-spezifische Antigene
gp120	externe Untereinheit von Env
gp41	Transmembranprotein
Gruppe M	Gruppe major
Gruppe N	Gruppe non-O, non-M
Gruppe O	Gruppe outlier
Gu-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
HAART	highly active antiretroviral therapy
HET	Heterosexuell
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPL	Hochprävalenzländer
IDE	Immun dominantes Epitop
IDU	injection drug user
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KAB	knowledge, attitude and behavior
KI[95%]	95% Konfidenzintervall
LTR	long terminal repeat
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
MIP	macrophage inhibitory protein
MSM	Männer, die Sex mit Männern haben
M-trope	monozytotrope
NIH	National Institut of Health
NKS	Neugeborenen Kälberserum
NNRTI	Nicht-nukleosidische RT Inhibitoren
NRTI	Nukleosid- und Nukleotidanaloga, RT-Inhibitoren
NSI	non-syncytia-inducing
NT-AK	neutralisierende Antikörper
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame/ offener Leserahmen
p12	Protease
p17	Matrixprotein
p24	Kapsidprotein
p32	Integrase
p66	Reverse Transkriptase
p7	Nukleokapsidprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, Polymerase chain reaction

PI	Proteaseinhibitoren
Pol	Polymerase
PPV / NPV	positiver / negativer prädiktiver Wert
Rantes	regulated upon activation T cell expressed and secreted
RI	richtig-inzident
RKI	Robert Koch-Institut
RP	richtig-prävalent
RPP	Referenzprobenpanel
RT	Reverse Transkriptase
RU	relative Units
SDF-1	stroma cell-derived factor 1
SI	syncytia-inducing
SIV	Simianes Immunodefiziens Virus
SIVcpz	SIV des Chimpanzen
SK	Serumkontrolle
STAHRs	serologischer Test Algorithmus für frische HIV-Infektionen
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50
TMB	Tetramethylbenzidine
T-trope	T-Zelltrope
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
V3	dritte variable Region des gp120
WB	Western Blot
WB-AI	Western Blot Aviditäts-Index
WHO	World Health Organisation; Weltgesundheitsorganisation
ZNS	zentrale Nervensystem

1 Einleitung

Die humanen Immundefizienzviren (HIV) HIV-1 und HIV-2 wurden erstmalig in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben [1-3] und als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS („acquired immunodeficiency syndrom“) identifiziert. Nach Schätzungen der WHO und UNAIDS lebten Ende 2007 weltweit etwa 33 Millionen Menschen mit HIV/AIDS. Im Jahr 2007 wurden weltweit 2,7 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert [4]. In Deutschland lebten Ende 2007 insgesamt ca. 59.000 HIV-1 infizierte Menschen. Seit Beginn der AIDS-Epidemie sind in Deutschland bisher ca. 33.800 Menschen an AIDS erkrankt und über 27.000 an AIDS verstorben [5]. Seit 25 Jahren ist HIV ein Forschungsgebiet, das in der Molekularbiologie und Immunologie bereits zu zahlreichen grundlegend neuen Erkenntnissen führte.

1.1 HIV

Die beiden Virustypen HIV-1 und HIV-2 sind die einzigen Vertreter humanpathogener Lentiviren in der Familie der *Retroviridae*. Aufgrund seiner Genomstruktur wird HIV zu den komplexen Retroviren gezählt. Zu den einfacher strukturierten Retroviren gehört zum Beispiel das Rous Sarkoma Virus, welches das zuerst entdeckte Retrovirus überhaupt war [6]. Lentivirusinfektionen verlaufen charakteristischerweise chronisch und zeigen eine lange klinische Latenzphase, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems.

1.1.1 Herkunft und Diversität

Wahrscheinlich geht HIV-1 auf drei verschiedene zoonotische Transmissionen des simianen Immundefizienzvirus (SIV) auf den Menschen zurück. Die drei HIV-1 Gruppen M, N und O stammen von den SIV_{cpz} des Schimpansen ab [7]. Möglicherweise könnte die Entstehung von Gruppe O („outlier“) Viren auch auf eine Übertragung von Gorillas auf den Menschen zurückgehen [8]. Weitere Diversifikation im Menschen führte vermutlich zur Ausbildung der einzelnen Subtypen in der Gruppe M („major“) [9, 10]. Die epidemisch am weitesten verbreiteten HIV-1 Stämme gehören zu dieser Gruppe. Sie wird aufgrund phylogenetischer Analysen genomischer Sequenzen in Subtypen (A1 - A4; B, C, D, F1 - F2, G, H, J; K) unterteilt. Weltweit am häufigsten sind Subtyp C-Infektionen, die mehr als die Hälfte aller HIV-1-Infektionen verursachen [11, 12]. In Nordamerika, Australien und Europa überwiegen Subtyp B-Infektionen [11], während in Zentralafrika alle bekannten Virusgruppen und Subtypen vorkommen. Zudem wurden diverse Isolate identifiziert,

die durch Rekombination von mindestens zwei unterschiedlichen Subtypen entstanden sind. Ein Beispiel für solche Mosaikviren ist das Virus CRF01_AE (CRF = „circulating recombinant form“), das aus den Subtypen A und E rekombiniert ist und in Thailand die epidemisch relevante Variante ist. Aktuell sind 43 CRF beschrieben [12], von denen CRF01_AE und CRF02_AG mit je 5% aller HIV die häufigsten weltweit sind [11]. Die Viren der Gruppe O sind in Kamerun und dessen Nachbarländern endemisch, stellen aber selbst dort mit einer Prävalenz von 2-5% der HIV infizierten Patienten eine Minderheit dar [13, 14]. HIV-1 der Gruppe N (non-M, non-O) sind bisher nur aus einer kleinen Anzahl Patienten ebenfalls in Kamerun isoliert worden [15-17] und sind epidemisch nicht relevant. Möglicherweise beeinflusst der Subtyp der Infektion den Krankheitsverlauf [18].

1.1.2 Morphologie und Genomstruktur von HIV-1

Alle Lentiviren sind morphologisch ähnlich aufgebaut. Die umhüllten infektiösen Partikel haben einen Durchmesser von etwa 100nm (Abb. 1). HIV-1 und HIV-2 weisen elektronenmikroskopisch die gleiche Morphologie auf, unterscheiden sich aber im Molekulargewicht pro Partikel und in den regulatorischen Genen [19].

Im Viruspartikel sind zwei identische RNA Moleküle von ca. 9,5kb verpackt. In der Lipoproteinhülle, die das Kapsid umhüllt, sind 72 etwa 10nm große Hüllglykoproteinkomplexe (Env = „envelope“) eingebettet. Außerdem enthält sie verschiedene Proteine, die aus der Wirtszelle stammen. Die Hüllproteine bestehen aus einer externen Untereinheit (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41). Da gp120 im reifen Partikel nicht kovalent an gp41 gebunden ist, kann es spontan freigesetzt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „shedding“. Das gp41 ist durch eine Transmembranregion von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren (AS) in der Lipoproteinhülle verankert. Das Matrixprotein (p17) ist an der Innenseite der Virushülle lokalisiert. Das Kapsid im Partikelinneren hat im reifen Partikel eine konische Form (Abb. 1) und wird vom Kapsidprotein (p24) gebildet. Kapsid- und Matrixproteine gehören zu den gruppen-spezifischen Antigenen (Gag-Proteine).

Die beiden HIV-RNA-Genome liegen gebunden an das Nukleokapsidprotein (p7) und die Reverse Transkriptase (p66) als Protein-Nukleinsäurekomplex vor. Neben der Reversen Transkriptase enthält das Viruspartikel noch die Enzyme Integrase (p32) und Protease (p12), die das Virus für seine Reifung und Vermehrung benötigt (Abb. 1).

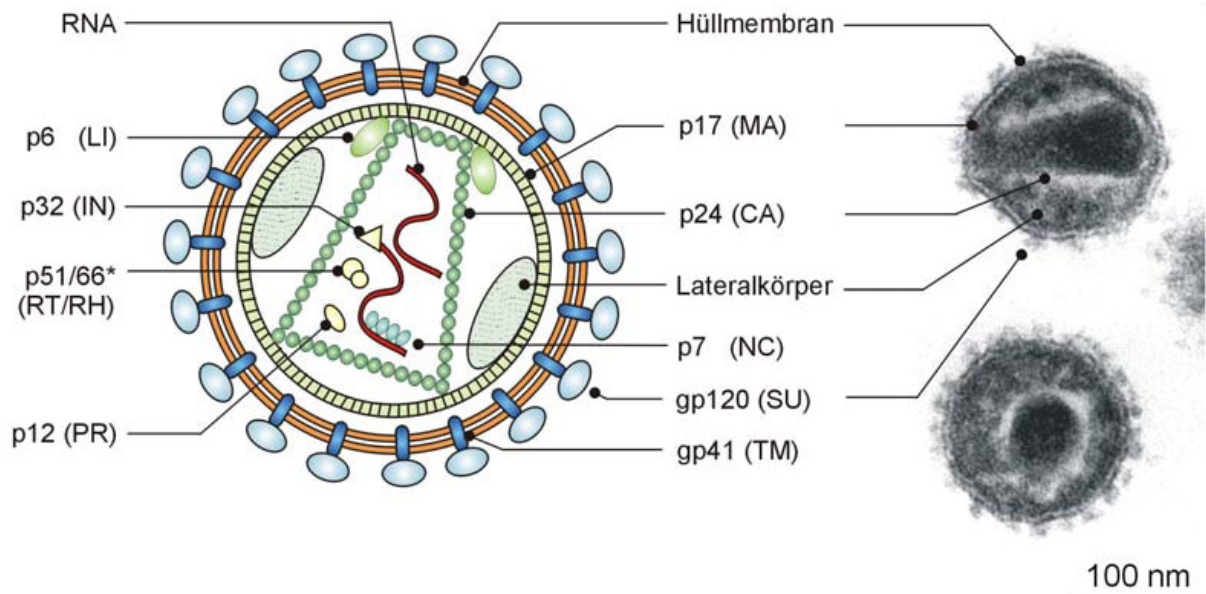


Abb. 1: Morphologie eines HIV-1 Partikels

Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines HIV-1 Partikels. Hüllmembran mit externen (gp120, SU) und transmembranen (gp41, TM) Glykoproteinen, gruppen-spezifischen Antigenen Link-Protein (LI, p6), Matrixprotein (MA, p17), Capsidprotein (CA, p24) und Nukleocapsidprotein (NC, p7), Enzyme Integrase (IN, p32), Reverse Transkriptase mit RNaseH (RT/RH, p51/66*) und Protease (PR, p12) sowie RNA und Lateralkörper. *Heterodimer. (Schema und elektronenmikroskopische Aufnahme mit freundlicher Genehmigung von H. Gelderblom).

Das HIV-Genom ist wie bei allen exogenen Retroviren im Wesentlichen aus den drei Genomregionen *gag* („group antigen“), *pol* („polymerase“) und *env* („envelope“) aufgebaut. Retrovirale Genome entsprechen dabei immer folgendem Schema:

5' LTR-*gag-pol-env*-LTR 3' (Abb. 2). Die drei Genomregionen werden von den LTR-Regionen („long terminal repeat“) flankiert, die bei der Integration des Provirus kovalent mit der chromosomalen Wirtszell-DNA verbunden werden. Während die *gag*- und *env*- Leserahmen (ORF = „open reading Frame“) für die internen Strukturproteine und die Glykoproteine der Virushülle kodieren, kodiert der *pol*- Leserahmen für die viralen Enzyme (Abb. 2).

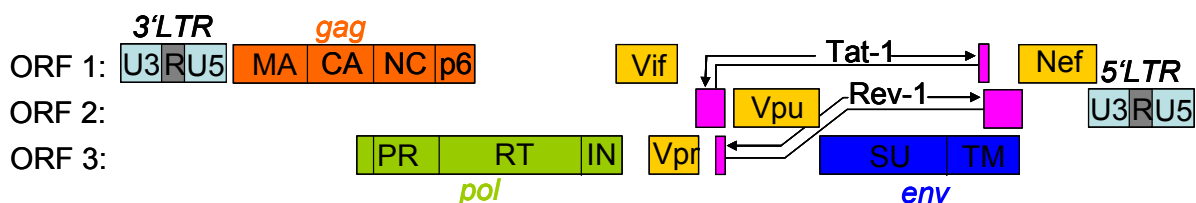


Abb. 2: Aufbau des proviralen HIV-1 Genoms

Flankiert von den LTRs (mit regulatorischen Sequenzen U3, R und U5 in hellblau) sind die drei Genomregionen *gag*, *pol* und *env*. Essentiell für die Replikation sind die Proteine Gag (in orange mit MA, CA, NC und p6), Pol (in grün mit PR, RT, IN), Env (in blau mit SU, TM) sowie mit zwei Exons Tat und Rev (in rosa). Akzessorische Proteine sind Vif, Vpr, Vpu und Nef (in gelb). Die verschiedenen Leserahmen zur Translation der Proteine sind angegeben (ORF 1, 2, 3).

Die ca. 9,5kb große genomische RNA von HIV-1, die ein 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz trägt, enthält zusätzlich noch sechs weitere offene Leserahmen, die für regulatorische Proteine kodieren (Abb. 2). Für die Replikation in der Zellkultur sind nur Tat und Rev essentiell, während die Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu in vitro nicht essentiell sind. Letztere werden auch als akzessorische Proteine bezeichnet. Tat und Rev werden von zwei Exons auf mehrfach gespleißter mRNA codiert.

1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1

1.1.3.1 Rezeptorbindung und Fusion

Der Hauptrezeptor für den Viruseintritt in die Wirtszelle von HIV-1 ist der CD4-Rezeptor (CD = „Cluster of differentiation“), er wurde bereits 1984 identifiziert [20, 21]. CD4 ist ein monomeres 58kDa Glykoprotein und befindet sich auf der Oberfläche von ca. 60% aller T-Lymphozyten, von T-Zellvorläufern in Knochenmark und Thymus, von Monozyten und Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Bestimmte Bereiche in der zweiten variablen Region von CD4 sind für die Bindung von gp120 essentiell. Die Bindung von gp120 an CD4 ist nicht nur ein wesentlicher Schritt bei der Infektion von CD4⁺ T-Zellen, sondern interferiert auch mit intrazellulären Signaltransduktionswegen und hat einen Apoptose-fördernden Effekt auf T-Zellen [22].

Schon früh konnte in Transfektionsexperimenten gezeigt werden, dass die Expression von humanem CD4 auf der Zelloberfläche für einen erfolgreichen Viruseintritt nicht ausreicht und mindestens ein weiterer Zelloberflächenfaktor notwendig ist [23]. Es dauerte allerdings fast zehn Jahre bis zu der Entdeckung, dass Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für den Eintritt von HIV in die Zelle fungieren. 1996 wurden innerhalb weniger Monate die beiden wichtigsten Korezeptoren identifiziert. Der „chemokine cc-motif receptor 5“ (CCR5) als notwendiger Korezeptor monozytotroper (M-troper) HIV-Isolate [24-26] und der Chemokinrezeptor CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) als Korezeptor T-zelltroper (T-troper) HIV-Isolate [27]. Für die M-tropen HIV wurde schon vor der Entdeckung des Korezeptors beschrieben, dass sie keine vielkernigen Synzytien hervorrufen (NSI-Viren = „non-syncytia-inducing“), während die T-tropen HIV Synzytien induzieren (SI-Viren = „syncytia-inducing“) [28, 29].

Nach der Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor kommt es zu einer Konfigurationsänderung im gp120. Diese Änderung ermöglicht eine Interaktion des immundominanten V3-Loops (V3 = dritte variable Region) von gp120 mit dem

spezifischen Korezeptor und indirekt eine weitere Konformationsänderung, die zu einer Exposition der Fusionsdomäne im gp41 führt [30]. Durch die Exposition der Fusionsdomäne kommt es zu einer Insertion des hydrophoben gp41-NH₂-terminalen Endes in die Membran der Zielzelle [31], welche die Fusion der viralen und der zellulären Membran auslöst.

1.1.3.2 Reverse Transkription und Integration

Bei der Membranfusion wird das Viruspartikel in das Zytoplasma entleert [32-34]. Direkt nach dem Eintritt kommt es zuerst zu einer Umschreibung der viralen RNA in provirale DNA im Zytoplasma der Zelle durch die Reverse Transkriptase (RT). Die trifunktionelle RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die durch ihre RNaseH-Aktivität die Hydrolyse des RNA/DNA-Hybrides ermöglicht. Anschließend wird durch die DNA-Polymerase-Aktivität der RT die cDNA zur Doppelstrang-DNA komplettiert. Dies ist einer der kritischsten Schritte im Lebenszyklus des Virus. Es sind mehrere zelluläre Faktoren bekannt, die an dieser Stelle eine Resistenz gegen HIV vermitteln. So kann zum Beispiel Trim5 α die Replikation von HIV in ruhenden CD4⁺ T-Zellen hemmen, und es wird postuliert, dass Trim5 α mit dem Uncoating der viralen RNA im Zytoplasma interferiert [35, 36]. Weitere Faktoren sind Murr1 [37] und APOBEC3G [38, 39], welche beide auf verschiedenen Wegen die HIV-1 Replikation in ruhenden, inaktiven CD4⁺ T-Zellen blockieren können.

Da die RT keine Korrekturfunktion für den Einbau fehlgepaarter Basen hat, werden bei der DNA-Synthese der beiden DNA-Stränge mit einer Einbaurrate von ca. 1 pro 10.000 Basen nicht komplementäre Basen eingebaut. Das führt zu einer Mutationsrate von etwa einer Mutation pro neu-synthetisiertem Genom [40, 41]. Während einige dieser Mutationen zu replikations-inkompetenten Viren führen, entstehen auch replikations-kompetente Viren, so dass aus dieser fehlenden Kopiergenauigkeit eine Vielzahl eng verwandter Virusvarianten entstehen, die dann durch die Immunantwort des Wirtes selektiert werden. Die Gesamtheit aller Virusvarianten in einem Patienten wird die virale Quasispezies genannt [42].

Nach dem Transport als Präintegrationskomplex in den Zellkern liegt die doppelsträngige HIV-DNA, die nun eine 5'-LTR und 3'-LTR besitzt, als provirale, nicht-integrierte Form vor. Erst nach einer Aktivierung der T-Zelle durch Mitogene oder Zytokine erfolgt vermutlich die Integration der proviralen DNA in die chromosomale Wirts-DNA durch das virale Enzym Integrase [43, 44].

Latent infizierte, ruhende CD4⁺ T-Zellen mit nicht integrierter HIV-DNA, stellen neben infizierten Monozyten, Makrophagen und Zellen des ZNS selbst unter Therapie langlebige Virusreservoir dar [45, 46].

Das stabil in das Wirtsgenom integrierte Provirus bleibt in der Zelle erhalten und wird bei ihrer Teilung an die Tochterzellen weitergegeben. Dadurch kommt es zu einer Persistenz der HIV-Infektion im Patienten und eine vollständige Eradikation der Infektion ist derzeit nicht möglich.

In einem kürzlich veröffentlichten Fall erhielt ein HIV-infizierter Patient aufgrund einer Leukemieerkrankung eine Knochenmarkstransplantation, bei der der Spender einen homozygoten Defekt für den CCR5-Rezeptor hatte. Somit konnten die HIV des Patienten, welche den CCR5-Rezeptor gebrauchten, nicht mehr replizieren (siehe 1.2.2). Bei diesen Patienten wurde auch 20 Monate nach der Transplantation ohne antiretrovirale Therapie kein replizierendes HIV mehr festgestellt [47]. Dies ist der bisher einzig belegte Fall einer möglichen Eradikation von HIV. Die Forscher können aber weder HIV-Reservoir in dem Patienten, noch neu entstehende Fluchtmutanten, welche einen anderen Ko-Rezeptor nutzen könnten, ausschließen.

1.1.3.3 Transkription und Translation

Erst nach Aktivierung der infizierten Zelle setzt die Synthese neuer Virionen ein. Nach Transkriptionsaktivierung des viralen LTR-Promoters wird die provirale DNA durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II abgelesen. Aufgrund der Aktivierung der Zelle durch Mitogene oder Zytokine werden zelluläre Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF- κ B in den Zellkern transportiert, binden an den HIV-5'-LTR-Promotor der proviralen DNA und initiieren die Transkription. In der frühen Phase werden zunächst die regulatorischen HIV-Proteine Tat und Rev von mehrfach gespleißten mRNAs synthetisiert. Tat bindet an das „TAT response element“ am 5'-Ende des viralen Transkripts im Zellkern, aktiviert dadurch die Transkription maximal und führt zur massiven Synthese vollständiger RNA-Transkripte (full-length RNA). Die full-length RNA trägt ein 5'-Cap und einen PolyA-Schwanz. Gleichzeitig wird Rev akkumuliert, das durch Bindung an das „Rev-responsive-Element“ im Env-kodierenden Bereich den Wechsel von mehrfach auf einfach gespleißte und ungespleißte RNAs induziert. Von diesen einfach gespleißten RNAs werden die Hüllproteine und die regulatorischen (akzessorischen) Proteine (Vif, Nef, Vpu und Vpr) translatiert [48]. Die ungespleißten Transkripte dienen sowohl als genomische RNA der neuen Virionen und auch als mRNA für die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polypeptide.

1.1.3.4 Zusammenbau, Knospung und Reifung

Den Kern der reifenden HIV-Partikel bilden die Proteine, die aus dem gag-Leserahmen entstehen. Die Hüllproteine entstehen durch proteolytische Spaltung aus den gp160-Vorläufermolekülen und werden in die Virushülle eingebaut. Das Vorläuferprotein wird nach der Synthese von der HIV-Protease in gp120 und gp41 durch eine zelluläre Protease (Furin) gespalten. Die HIV-Gag-Proteine werden dagegen durch die viruseigene Protease aus dem p55-Vorläufermolekül gebildet, aus dem durch die Spaltung p24, p17, p9 und p7 Gag-Proteine entstehen.

Die HIV-Protease schneidet sich erst während der Knospung (auch „Budding“ genannt) selbst aus, so dass die Gag- und die Gag/Pol-Vorläuferproteine erst nach der Freisetzung des Partikels und nicht schon im Zytoplasma gespalten werden.

Der erste Schritt bei dem Zusammenbau der Viruspartikel ist die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes an der Zellmembran aus zwei Molekülen der genomischen RNA, tRNA, Lys, Gag- und Gag-Pol-Polypoteinen [19]. Die RT und die Integrase werden auch in die Partikel verpackt. Dabei interagieren vermutlich die RNA und das Nukleokapsidprotein [49] sowie das transmembrane Glykoprotein gp41 und das Matrixprotein p17 [50, 51], um den Einbau aller notwendigen Proteine in die entstehenden Partikel zu gewährleisten. Die Lipidhülle des Virus wird von der Wirtszelle mitgenommen, zeigt aber gegenüber der Plasmamembran eine Anreicherung bestimmter Phospholipide und Cholesterol sowie selektiv integrierte zelluläre Proteine [52-54]. Die zellulären Proteine tragen dazu bei, dass die Viren vom wirtseigenen Komplementsystem nicht erkannt und zerstört werden [55]. Nach dem Zusammenbau erfolgt die Knospung und die extrazelluläre Reifung [56].

1.2 Verlauf der HIV-Infektion

Am häufigsten wird HIV sexuell übertragen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Ausprägung der Immunschwäche, die opportunistische Infektionen ermöglicht und schließlich zum Tod führt. Die verschiedenen Stadien und Abläufe sind äußerst komplex. Im folgenden Abschnitt soll daher nur ein kurzer Überblick über die wichtigsten Mechanismen und Abläufe gegeben werden.

1.2.1 Die akute Infektion

Bei ungefähr 30% der Patienten kommt es ca. zehn Tage nach einer Infektion zu Symptomen ähnlich eines grippalen Infektes [57]. Diese klinische Symptomatik wird auch das akute retrovirale Syndrom genannt [58] und kann sich durch Fieber,

Unwohlsein, Kopfschmerzen, Appetitverlust, Hautausschlägen und ähnlichem äußern. Häufig wird das akute HIV-Syndrom aber nicht erkannt.

Das Virus wird meistens über das Schleimhautepithel von primären Zielzellen, den intraepithelialen dendritischen Zellen, aufgenommen. Die dendritischen Zellen werden aber nur sehr selten selbst infiziert, sondern binden das HIV mittels eines spezifischen Rezeptors, dem DC-SIGN („dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin“) und transportieren das Virus dann über die Lymphwege in die Lymphknoten, in denen die primäre Verbreitung der Viren in die Hauptzielzellen von HIV (CD4⁺-Zellen) stattfindet.

In dieser ersten Phase von sieben bis zehn Tagen nach Infektion kommt es zu einem sehr starken Viruslastanstieg von zehn bis 1.000 Millionen infektiöse Viruspartikel pro ml Plasma [59] und einem daraus resultierenden Einbruch der Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten des Immunsystems (Abb. 3).

Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen. In dieser Phase ist die Infektion nur durch einen HIV-RNA-Nachweis mit RT-PCR möglich (direkter Genomnachweis), da Antikörper in dieser frühen Infektionsphase noch nicht gebildet werden. Nach ca. 14 bis 17 Tagen ist dann das Kapsidprotein p24 als Surrogatmarker für HIV im Blut nachweisbar [59]. Ca. 3-4 Wochen nach der Infektion beginnt die Serokonversion und das Immunsystem kann die Infektion zunächst scheinbar kontrollieren (Abb. 3). Die Viruslast und dementsprechend auch der p24-Gehalt im peripheren Blut sinken schnell.

Die CD4⁺-Zellzahl stabilisiert sich, erreicht sogar oft wieder den Normalbereich, aber meist nicht mehr den individuellen Ausgangswert vor der Infektion. Die schnelle und erfolgreiche Senkung der Viruslast sowie der starke Anstieg der CD8⁺-Zellen sind klare Zeichen einer zunächst erfolgreichen Immunabwehr durch zytotoxischen T-Zellen (CTL). In der humoralen Antikörperantwort werden zunächst IgM-Antikörper (Ig = Immunglobulin) gebildet. Diese IgM-Antikörper sind individuell unterschiedlich lange nachweisbar. Wie bei fast allen Infektionserkrankungen erfolgt ca. vier Wochen nach der Infektion der Wechsel zu IgG-Antikörpern [60].

1.2.2 Die chronische Phase der Infektion

Mit dem Wechsel zu den IgG-Antikörpern beginnt die in der Regel über mehrere Jahre andauernde symptomfreie klinische Latenzphase der Infektion, in der Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar sind [61]. Der IgG-Titer der HIV-spezifischen Antikörper bleibt stabil hoch und die Viruslast stellt sich auf ein bestimmtes Niveau ein („Setpoint“, Abb. 3).

Für die Prognose des Krankheitsverlaufes ist es wichtig, auf welcher Höhe sich die Viruslast einstellt, da man aufgrund ihrer Höhe Prognosen über den zu erwartenden Verlauf der Infektion stellen kann [62]. Meist liegt der Setpoint zwischen 10.000 und 50.000 Genomkopien pro ml Plasma. Ein hoher Setpoint ($> 100.000/\text{ml}$ Plasma) ist mit einem schnelleren Erreichen des AIDS-Stadium assoziiert, während für einen Patienten mit niedrigem Setpoint ($< 10.000/\text{ml}$ Plasma) ein langsamerer Verlauf und damit eine längere Latenzzeit bis zum Ausbruch von AIDS vorhergesagt werden kann. Je höher die Viruslast ist, umso rascher fallen die CD4^+ -Zellen in der Folgezeit ab.

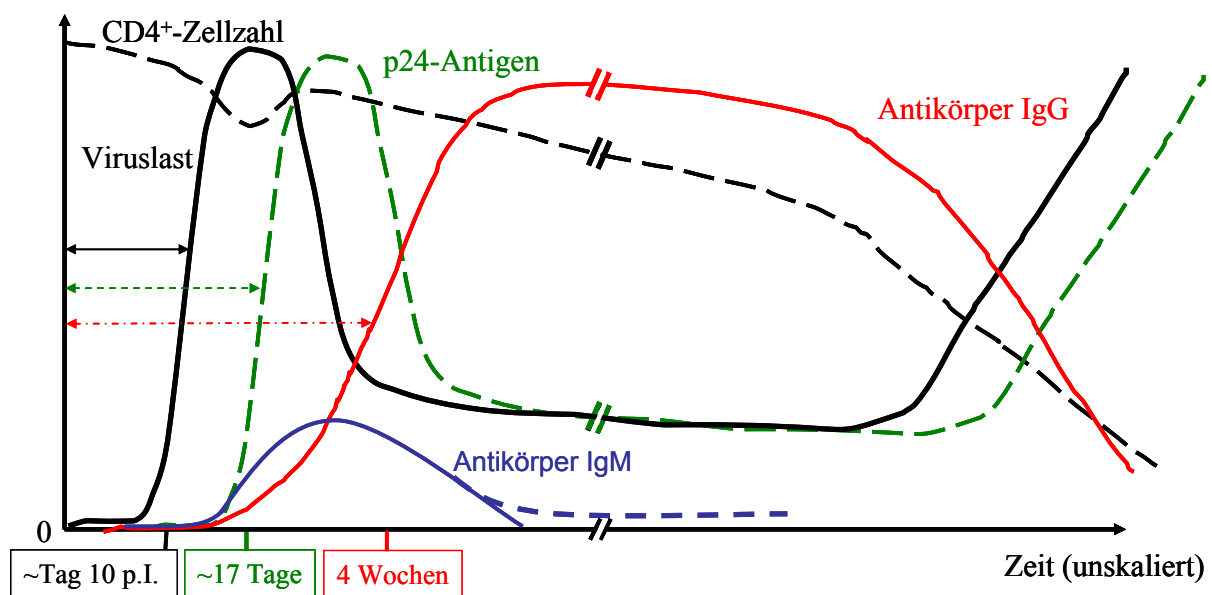


Abb. 3: Diagnostische Verlaufsparemeter einer HIV-Infektion

Laborparameter im zeitlichen Verlauf (verändert nach Fiebig *et al.* 2003 [59]).

Es sind inzwischen eine Reihe von genetischen Wirtsmarkern charakterisiert worden, die ebenfalls den Verlauf der Erkrankung beeinflussen. So gibt es zum Beispiel eine Mutation im CCR5 Korezeptor, bei dem eine Deletion von 32 Basenpaaren (bp) im CCR5-Gen ($\text{CCR5}\Delta 32$) dazu führt, dass dieser Rezeptor bei Menschen mit homozygoter Defizienz nicht präsentiert wird. In diesen Menschen können sich die M-tropen HIV, welche CCR5 als Korezeptor benötigen, nicht vermehren. Da in der frühen HIV-Infektion meist M-trope Viren auftreten, haben Patienten mit homozygoter oder heterozygoter $\text{CCR5}\Delta 32$ Mutation eine günstigere Infektionsprognose. $\text{CCR5}\Delta 32$ Homozygotie führt zu einer verminderten Suszeptibilität gegenüber einer HIV-Infektion. Aufgrund dieser Entdeckung wurde eine neue Medikamentenklasse, die CCR5-Antagonisten, entwickelt.

Der erste Vertreter dieser Klasse, Maraviroc (Pfizer), wird seit letztem Jahr erfolgreich in der Therapie von Patienten mit R5-Viren eingesetzt. HLA-Polymorphismen (Humanes Leukozyten Antigen) der MHC-Klasse-I-Proteine (MHC = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex) sind weitere Faktoren, die entweder mit einem günstigeren Verlauf (zum Beispiel B14, B27, B51, B57 und B63) oder mit einem ungünstigeren Verlauf (zum Beispiel A23, B22, B35, B37 und B49) der Erkrankung assoziiert sind.

Gegen Ende der klinischen Latenz kommt es zunächst, wie kurzzeitig in der akuten Infektion, häufig zu einer Lymphadenopathie, die durch eine mindestens drei Monate andauernde Vergrößerung von mindestens zwei peripheren Lymphknoten charakterisiert ist. Dies kann unbehandelt mehrere Wochen bis Jahre andauern. Kommt es zu weiteren Symptomen wie Fieber, Gewichtsverlust und/oder zu ersten opportunistischen Krankheiten (zum Beispiel Candida, Herpes, etc.), so spricht man vom Stadium des „AIDS-related complex“. Während dieses Stadiums kann die $CD4^+$ -Zellzahl bereits auf unter 400 Zellen pro μl sinken.

1.2.3 Das AIDS-Stadium

Sinkt die $CD4^+$ -Zellzahl weiter auf unter 200 Zellen pro μl kommt es zum AIDS-Stadium. Aufgrund des ausgeprägten Immundefektes kommt es unbehandelt zu Erkrankungen mit opportunistischen Erregern und zum Auftreten maligner Tumore. Auch zeigen Patienten im AIDS-Stadium oft neurologische Symptome (HIV-bedingte Enzephalopathie). Die Immunantwort bricht zusammen, es kommt zu einem Anstieg der Viruslast, da das Immunsystem die Infektion nun nicht mehr kontrollieren kann. Durch die starke Reduzierung der $CD4^+$ -Zellen sinken auch die im Blut nachweisbaren HIV-spezifischen Antikörper. Unbehandelt beträgt die Lebenserwartung nach Eintritt in das AIDS-Stadium weniger als zwei Jahre.

1.3 Diagnostik von HIV-Infektionen

Die in diesem Abschnitt beschriebene Diagnostik bezieht sich in erster Linie auf die HIV-Diagnostik in Deutschland, die sich aber nicht wesentlich von Vorgaben anderer Industrieländer mit niedriger Prävalenz, vor allem West-Europa und den USA sowie Australien, unterscheidet.

International wird für eine HIV-Diagnose laut der WHO seit 2008 ein Suchtest und eine Viruslast-Bestimmung benötigt. Für die HIV-Diagnose in Deutschland gilt aber noch die alte Vorgabe, nach der ein Suchtest und ein Bestätigungstest (Immunoblot) benötigt wird.

In Deutschland wird üblicherweise venöses Blut abgenommen und hieraus Serum oder Plasma gewonnen, welches dann auf HIV-Antikörper in einen „Enzyme linked immunoabsorbent assay“ (ELISA) untersucht wird. Das Ziel der Diagnostik bzw. des HIV-Antikörper-Suchtestes ist eine möglichst frühzeitige Erfassung der Antikörper des Infizierten und die sichere Erfassung aller Virustypen und Subtypen. Es gibt HIV-ELISA-Teste verschiedener Generationen. Die HIV-ELISA-Teste der ersten Generation verwendeten lysiertes und inaktiviertes, partiell gereinigtes Virus aus infizierten CD4⁺-T-Zelllinien humanen Ursprungs. Die Teste der zweiten Generation verwendeten gereinigte, gentechnisch oder synthetisch hergestellte Gag- und Env-Proteine. Für die dritte Generation wurden auch synthetische Peptide des Hüll- und des Transmembran- oder Kernproteins verwendet. Der Nachweis virusspezifischer Antikörper ist mit dem Test der dritten Generation durchschnittlich 22 Tage nach der Infektion erreichbar.

Bei der derzeit aktuellen vierten Generation der HIV-ELISA-Teste ist dies im Durchschnitt sogar schon 18 Tage nach der Infektion möglich, da diese Teste gleichzeitig virusspezifische Antikörper und HIV-p24-Antigen nachweisen. In Deutschland, einem Land mit einer niedrigen HIV-Prävalenz, sollen entsprechend den Empfehlungen der Gesellschaft für Virologie (GfV) und des Diagnostikausschusses der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten (DVV) zwei Suchteste mit unterschiedlichen Antigen-Bestandteilen durchgeführt werden.

Alle im Suchtest reaktiv getesteten Patienten-Proben müssen mit einem Bestätigungstest verifiziert werden, um einen falsch-positiven Befund auszuschließen. Ein Bestätigungstest ist notwendig, da kreuzreaktive Antikörper zu falsch-positiven Suchtest-Ergebnissen führen können. Kreuzreaktive Antikörper werden beispielsweise bei Allergien oder bei anderen Infektionen des Patienten (z. B. Influenza) oder Schwangerschaften beobachtet. Im Bestätigungstest wird die Spezifität der HIV-Antikörper geprüft. Dazu wird in der Regel die spezifische Reaktion der Antikörper mit viralen Antigenen im Immunoblot analysiert. In diesem Test wird erkannt, gegen welche viralen antigenen Determinanten die HIV-spezifischen Antikörper gerichtet sind. Vor der endgültigen Diagnose muss das Ergebnis anhand einer zweiten unabhängigen Blutprobe bestätigt werden, um eine Probenverwechslung auszuschließen.

1.4 Therapie

Zur Behandlung einer HIV-Infektion gibt es derzeit Medikamente aus sechs Wirkstoffklassen [63]: Inhibitoren der Reversen Transkriptase (Nukleosid- und Nukleotidanaloga NRTI und Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren NNRTI), Proteaseinhibitoren (PI), Fusionsinhibitoren, Entry-Inhibitoren und die neueste Klasse der Integraseinhibitoren. Eine hoch wirksame antiretrovirale Therapie (HAART = „highly active antiretroviral therapy“) setzt sich aus drei (oder mehr) verschiedenen Medikamenten aus mindesten zwei verschiedenen Wirkstoffklassen zusammen (üblicherweise zwei NRTI plus ein PI oder NNRTI). Durch diese Therapiemöglichkeiten konnte die Lebenszeit und die Lebensqualität der Patienten erheblich verbessert werden. Trotz vieler Bemühungen der Pharmaindustrie, die Medikamente zu verbessern und verträglicher für die Patienten zu machen, beeinträchtigen zum einen die teilweise starken Nebenwirkungen dieser Medikamente sowie zum anderen das Risiko der Resistenzentwicklung von HIV gegenüber den eingesetzten Medikamenten den langzeitigen Behandlungserfolg. Üblicherweise wird eine Therapie in den Industrieländern erst begonnen, wenn die CD4⁺-Zellzahl unter 400 Zellen pro μ l sinkt, oder Krankheitssymptome auftreten, welche dringend behandelt werden müssen.

Bis heute ist noch unklar, wann der optimale Zeitpunkt für einen Therapiebeginn ist. Nach der Einführung von HAART im Jahr 1996 wurde in einigen Studien untersucht, ob bei Patienten, die früh nach Infektion therapiert wurden, ein verbesserter Krankheitsverlauf zu beobachten war als bei Patienten, bei denen die Therapie erst spät (< 400 CD4⁺-Zellen) begonnen wurde [64-66]. In diesen Studien wurde kein verbessertes Therapieansprechen bei frühem Beginn beobachtet. Da Langzeittherapie zu Nebenwirkungen, Adhärenzproblemen und auch zu Resistenz von HIV führen kann, sehen die aktuellen Therapierichtlinien der Deutschen AIDS-Gesellschaft einen Therapiebeginn bei 350-400 CD4⁺-Zellen vor [67]. Aufgrund verbesserter Medikamentenkombinationen und sequentieller Therapiestrategien ist jedoch erneut eine Diskussion entstanden, ob eine sehr frühe Therapie nicht doch erfolgversprechender wäre. In einer jüngeren Studie wurde ein Vorteil bei frühem Therapiebeginn beobachtet [68].

Vor Beginn einer antiretroviralen Behandlung sollte eine genotypische Resistenzbestimmung der HIV-Quasispezies des Patienten durchgeführt werden. Hiermit wird überprüft, ob HIV vorliegen, die gegen ein oder mehrere Medikamente primär resistent sind (durch eine Übertragung resistenter HIV), um dann die Therapie an die Resistenzlage anzupassen.

In der RKI Serokonverterstudie wurde von 1997 bis 2007 in Therapie-naiven Patienten eine Übertragungshäufigkeit von 14% von resistenten HIV gefunden [69]. Bei einem erfolgreich therapierten Patienten soll die Viruslast unter die Nachweisgrenze von 50 Genomkopien pro ml sinken.

1.5 Die Immunantwort gegen HIV

Es werden zwei grundlegende Mechanismen der Immunabwehr unterschieden. Zum einen gibt es die unspezifische, nichtadaptive Immunantwort und zum anderen die Antigen-spezifische, adaptive Immunantwort, welche die humorale und zelluläre Immunantwort beinhaltet. Die wichtigsten Komponenten der adaptiven Immunantwort sind Antigen-präsentierende Zellen (APC), $CD4^+$ -T-Zellen, $CD8^+$ -T-Zellen und der körpereigene MHC. Zu den APC gehören dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten. Unter den APC sind die dendritischen Zellen die potentesten Induktoren einer adaptiven Immunantwort. Zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen (CTL) erkennen ihr Antigen im Zusammenhang mit dem MHC-Klasse I-Rezeptor, während $CD4^+$ -T-Zellen den MHC-Klasse II-Rezeptor zur Erkennung benötigen [70].

$CD4^+$ -T-Zellen können je nach ihrem Sekretionsmuster in T-Helferzellen (T_H) T_{H1} und T_{H2} unterschieden werden. T_{H1} sezernieren hauptsächlich Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ , welche die Effektorfunktionen (CTL, Natürliche Killer Zellen, Makrophagen) des Immunsystems unterstützen. T_{H2} produzieren Zytokine (IL-4, IL-10, IL-5 und IL-6), die eine humorale Immunantwort begünstigen. Beide Helferzellantworten findet man bei einer HIV-Infektion, ohne das sie jedoch den Erreger eliminieren können.

1.5.1 Die zelluläre Immunabwehr

CTL spielen bei der Bekämpfung viraler Infektionen eine entscheidende Rolle [71]. Sie erkennen exprimierte virale Proteine bzw. Fragmente hiervon, die durch MHC-Moleküle der APC präsentiert werden [72]. Die $CD8$ -Zellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den Peptid/MHC-I-Komplex. Es erfolgt eine Aktivierung der CTL und die infizierte Zelle wird mit Hilfe von Perforin und Granzymen zerstört. Diese frühen spezifischen CTL treten bei einer HIV-Infektion schon innerhalb einer Woche nach Infektion auf [73, 74] und sind verantwortlich für den starken Abfall der Viruslast im Plasma als auch der $CD4^+$ -T-Zellen während der akuten Infektionsphase [75-77]. Auch während der gesamten asymptomatischen Phase einer HIV-Infektion ist die CTL-Antwort gegen HIV wirksam und kann in verschiedenen Geweben wie Blut, Lunge, Milz, Gehirn und Lymphgewebe nachgewiesen werden [78-81].

Die viralen Proteine, gegen die sich die CTL-Aktivität hauptsächlich richtet, sind Gag, Pol und Env. Aber auch gegen die regulatorischen Proteine Tat, Vif, Rev und Nef wurde schon eine CTL-Antwort nachgewiesen [82]. Die bekannten CTL-Epitope im viralen Genom wurden von Frahm *et al.* zusammengefasst [83]. Obwohl über 300 Epitope von HIV mit dem entsprechenden MHC-I-Typ bekannt sind und diese in zum Teil stark konservierten Bereichen des HIV liegen, ist bis heute nicht geklärt, weshalb eine vollständige Eliminierung der HIV produzierenden Zellen durch CTL nicht erreicht wird. Zusätzlich zu ihrer lytischen Aktivität sezernieren CTL auch Faktoren, welche sich inhibierend auf die Virusreplikation auswirken. So können zum Beispiel die drei β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β („macrophage inhibitory protein“) und RANTES („regulated upon activation T cell expressed and secret“) als CCR5-Liganden für den HIV CCR5-Korezeptor und auch IL-16 die Replikation von HIV in infizierten primären Blutmonozyten in Zellkultur inhibieren [84, 85]. Bei Eintritt in die symptomatische Phase der HIV-Infektion sinkt die CTL-Antwort und verschwindet schließlich nahezu vollständig [86].

1.5.2 Die humorale Immunabwehr

Mit Beginn der Serokonversion wird die humorale Immunantwort messbar und dementsprechend können auch direkt nach der Infektion keine Antikörper gemessen werden. Zuerst müssen hierzu T-Helferzellen die B-Zellen stimulieren, welche dann durch Proliferation und Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen werden und die Antikörperbildung beginnen. Die Grundstruktur der Immunglobuline besteht aus jeweils zwei identischen leichten und schweren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Immunglobuline werden aufgrund ihrer serologischen und physikochemischen Unterschiede in den konstanten Regionen ihrer schweren Ketten in Klassen (IgA, IgD; IgE; IgG und IgM) und Subklassen (zum Beispiel IgG1 – 4) eingeteilt. Ihre Spezifität erhalten die Antikörper durch die variablen Regionen der leichten Ketten.

Untersuchungen der subklassenspezifischen Antikörper-Antwort auf virale Antigene von HIV zeigten eine überwiegende IgG1- und IgG3-Antwort [87]. In der ersten Zeit nach der Infektion werden hauptsächlich Antikörper gegen verschiedene Epitope der Strukturproteine Gag und Env gebildet. So bildet nahezu jeder Patient Antikörper gegen eine immundominante Region auf dem viralen Hüllprotein gp41. In der späteren asymptomatischen Phase sind gegen fast alle viralen Proteine Antikörper nachweisbar [61].

Antikörper können sowohl gegen freie Viren als auch gegen infizierte Zellen wirken, wobei die Neutralisation freier Viruspartikel den Großteil der antiviralen Aktivität ausmacht. Diese Virus-neutralisierenden Antikörper sind in der Lage, *in vitro* die Infektion von CD4⁺ Zellen mit HIV-Laborstämmen zu verhindern [88-90]. So beinhaltet zum Beispiel die Aminosäuresequenz des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 zwei Epitope, die von den neutralisierenden monoklonalen Antikörpern 2F5 und 4E10 erkannt werden. Diese beiden Antikörper zeigen ein Subtyp-generisches HIV-1 Neutralisationsspektrum. Ähnlich wie bei den CTL üben neutralisierende Antikörper jedoch einen Selektionsdruck auf die Viren aus und bewirken dadurch Fluchtmutationen („Escape“-Mutationen) von HIV [91].

1.6 Aktuelle Probleme der HIV-Epidemiologie in Deutschland

Für das Jahr 2007 wurden in Deutschland 2.752 HIV-Neudiagnosen an das RKI gemeldet [5]. Im Vergleich zum Jahr 2001 mit 1.443 gemeldeten Neudiagnosen entspricht dies einer Zunahme um 90%. Betrachtet man die Verteilung der Transmissionsgruppen unter den Neudiagnosen, so stellen Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), mit 65% der neu diagnostizierten HIV-Infektionen die größte Gruppe dar. Personen, die ihre HIV-Infektion durch heterosexuelle Kontakte (HET) erworben haben und nicht aus Hochprävalenzländern stammen, stellen mit 17% erstmalig seit dem Jahr 2001 den zweiten Platz und verdrängten die Personengruppe, die aus Ländern mit einer hohen HIV-Prävalenz in der Bevölkerung stammen (HPL = Hochprävalenzländern), mit 11% auf den dritten Platz. An vierter Stelle steht mit 6% unverändert seit 2001 die Gruppe der Personen, welche sich über intravenösen Drogengebrauch infiziert haben (IDU). Der Anteil der Frauen unter den Neudiagnosen lag im Jahr 2007 bei 16% und nahm damit, im Gegensatz zur Entwicklung in Osteuropa, nicht zu.

Bei der Analyse dieser Daten stellt sich die Frage, inwieweit die beobachtete Zunahme durch eine tatsächliche Zunahme von neu erworbenen Infektionen, durch eine verstärkte Testung von bereits Jahre zuvor infizierten Personen, durch eine verbesserte Meldung und Erkennung von Neudiagnosen oder durch eine Kombination der genannten Faktoren bedingt ist [5].

Sicherlich ist zumindest ein Teil des Anstiegs der Neudiagnosen auf eine verbesserte HIV-Neudiagnostik zurückzuführen. Wenn der Anstieg der Neudiagnosen nur mit der verbesserten Erkennung erklärbar wäre, hätte sich am eigentlichen Infektionsgeschehen nichts verändert.

In diesem Falle könnte es sein, dass die Zunahme durch vermehrte Testung schon länger infizierter Personen bedingt ist. Wenn dagegen die Zunahme von HIV-Neudiagnosen eine tatsächliche Zunahme von HIV-Neuinfektionen widerspiegelt, würde dies auf Defizite bei der HIV-Prävention hinweisen und es müsste untersucht werden, in welchen Personengruppen und warum Infektionen zunehmen und welche Schritte erforderlich sind, um der Zunahme entgegenzuwirken.

In der Bundesrepublik Deutschland wurde bis Anfang der 90er Jahre über das Rückrechnungsmodell, ausgehend von AIDS-Fallberichten, der Anteil der HIV-Neuinfektionen berechnet [92, 93]. Anschließend wurde aufgrund der gemeldeten positiven HIV-1-Bestätigungsteste und der kodierten HIV-Meldungen versucht, eine Aussage über die Anzahl der Neuinfizierten und deren Verteilung zu treffen. Ein großes Problem war hierbei vor allem die unbekannte Anzahl an Doppelmeldungen. Durch das Infektionsschutzgesetz (IfSG) und die damit verbundene Meldepflicht von HIV-1-Diagnosen hat sich die Datenlage erheblich verbessert und damit auch der Anteil potentieller Doppelmeldungen deutlich verringert.

Insgesamt lassen sich die HIV-1-Prävalenz, also der Gesamtanteil an HIV-Infizierten pro 100.000 Einwohner, sowie die Anzahl an HIV-Neudiagnosen pro Jahr gut bestimmen. Eine Inzidenz, also die Anzahl an Neuinfizierten pro Jahr und pro 100.000 Einwohner, lässt sich aufgrund dieser Meldedaten jedoch nur schwer schätzen, da hierzu der Anteil an frisch Infizierten unter Neudiagnosen ermittelt werden müsste. Um die HIV-Inzidenz zu bestimmen, müsste man über eine Labormethode verfügen, welche zwischen einer frischen (inzidenten) und einer länger bestehenden (prävalenten) HIV-Infektion unterscheiden kann. Alternativ müsste man aufgrund der niedrigen Prävalenz in Deutschland eine sehr große Anzahl an seronegativen Personen in Kohorten führen, um daraus die Inzidenz zuverlässig berechnen zu können.

Um die Effektivität der Präventions-Arbeit zu überprüfen und adäquat anzupassen, würde die Bestimmung des tatsächlichen Anteils an Neuinfektionen unter den neudiagnostizierten Patienten eine wichtige Information zur Ermittlung der HIV-Inzidenz liefern und damit zu einem besseren Verständnis des Infektionsgeschehens in Deutschland beitragen.

1.7 Methoden zur Inzidenzbestimmung

Die HIV-1-Inzidenz in einer Bevölkerung bestimmen zu können, ist wichtig zum Verständnis der Transmissionsdynamik der HIV-Epidemie, zur Identifikation von Risikogruppen sowie zur Bewertung des Erfolges der Präventions-Maßnahmen, um diese gegebenenfalls anpassen zu können. Auch für HIV-Impfstudien ist eine vorherige Messung der HIV-Inzidenz unerlässlich, da nur in Populationen mit hoher HIV-Inzidenz der Erfolg einer Impfstudie bewertet werden kann [94]. Während man die HIV-Prävalenz im Rahmen der Routine-HIV-Diagnostik relativ gut messen und bewerten kann, ist die direkte Messung der HIV-Inzidenz erheblich schwerer.

Diese zu bestimmen ist aber genauso wichtig, da Änderungen in der HIV-Prävalenz nicht immer den Trends in der HIV-Inzidenz entsprechen müssen. Eine Abnahme der Gesamt-HIV-Prävalenz kann einen Anstieg in der HIV-Inzidenz in bestimmten Risikogruppen überdecken [95]. Auch wenn es in der Routine-HIV-Diagnostik sehr sensitive Methoden zur HIV-Antikörper-Messung gibt (HIV-Such-Teste der dritten und vierten Generation, siehe 1.3), kann ausschließlich auf der Basis des Antikörper-Nachweises im diagnostischen HIV-ELISA nicht zwischen inzidenten und prävalenten Infektionen unterschieden werden. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Methoden entwickelt, welche die Messung inzidenter HIV-Infektionen realistisch werden lassen. Für die Bestimmung der HIV-Inzidenz, speziell in Ländern mit sehr niedriger HIV-Prävalenz wie Deutschland, müssten allerdings auch mit solchen Inzidenz-Testen eine sehr große Anzahl an Personen getestet werden.

1.7.1 Longitudinale Studien

Der klassische, epidemiologische Weg zur Bestimmung der Inzidenz einer Infektion in der Bevölkerung ist die longitudinale Beobachtung einer seronegativen Population mit Infektionsrisiko [96]. In einer Bevölkerung mit einer niedrigen HIV-Prävalenz muss man sehr viele Menschen über mehrere Jahre beobachten und immer wieder testen, um eine sichere Aussage über die Inzidenz von HIV-Infektionen machen zu können. Dies bedeutet nicht nur einen hohen logistischen Aufwand sondern auch sehr hohe Kosten. Sehr häufig werden daher in Ländern mit niedriger HIV-Prävalenz Kohorten-Studien durchgeführt, in denen bekannte Hochrisikogruppen (zum Beispiel MSM, IDU, Prostituierte, HPL) gezielt untersucht werden. Diese Kohorten-Studien lassen aber nur schwer Rückschlüsse auf die Gesamtbevölkerung zu.

Ein weiteres Problem dieser Methode ist, dass man durch die Information über die Studie die zu untersuchende Bevölkerung oder die Bevölkerungsgruppe besser aufklärt,

dadurch das Risikobewusstsein und gegebenenfalls das Verhalten verändert und somit auch die Inzidenz beeinflusst [97].

Nach wie vor ist die Untersuchung definierter Kohorten aber die einzige epidemiologische Methode, um die Inzidenz verlässlich abschätzen zu können, da sich die Inzidenz als Anzahl der Neuinfektionen pro Jahr pro 100.000 Einwohner definiert. Aus epidemiologischer Sicht muss man daher die negativ gebliebene Bevölkerung ebenfalls erfassen.

Will man nur den Anteil der Neuinfektionen unter den Neudiagnosen bestimmen, reichen Labormethoden aus, die anhand einer Blutprobe zum einen eine HIV-Infektion feststellen und zum anderen die Patienten detektieren, die sich neu in einem bestimmten Zeitraum infiziert haben.

1.7.2 Rückrechnung anhand der AIDS-Fallzahlen

Rückrechnungsmodelle setzen ein Meldesystem voraus, mit dem national (oder in der Bevölkerung, welche man untersuchen möchte) die Anzahl der an AIDS erkrankten und verstorbenen Menschen erfasst werden. Anhand dieser Meldedaten kann dann berechnet werden, wie viele Patienten sich pro Jahr neu infiziert haben, da der Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt der HIV-Infektion bis zur Manifestation von AIDS eingrenzbar ist [92, 93]. Die beiden Hauptprobleme dieser Methode sind die meist unzureichenden Meldesysteme mit den dadurch entstehenden Doppelmeldungen oder nicht erfassten AIDS-Fällen, sowie die immer besser funktionierende Therapie, die den Zeitraum zwischen Infektion und den Ausbruch von AIDS verlängert hat.

Seit dem Beginn von HAART mit ihrem drastischen Rückgang in Morbidität und Mortalität der HIV-Infizierten kann diese Methode nicht mehr verwendet werden.

1.7.3 Akut-Syndrom

In der Klinik kann eine primäre frische HIV-Infektion durch das „Akute Syndrom“ diagnostiziert werden (vgl. Kapitel 1.2). Wenn dieses durch einen HIV-RNA-Nachweis oder einen positiven p24-Antigentest und einen gleichzeitig seronegativen Status ergänzt wird, ist eine Serokonversion und damit eine frühe HIV-Infektion gesichert diagnostiziert. Allerdings sollte die Serokonversion anhand einer Verlaufsprobe des Patienten mit einem Bestätigungstest gesichert werden, um eine falsch-positive Diagnose auszuschließen. Voraussetzung dazu ist jedoch, dass man den Patienten genau in dem schmalen Zeitfenster erfasst, in dem er noch keine Antikörper gebildet hat.

Aber es bildet nicht jeder Patient mit einer primären HIV-Infektion das Akute Syndrom aus oder erkennt diese nicht. Demzufolge wird ein großer Teil der Patienten keinen Arzt aufsuchen und nicht als frühe HIV-Infektion diagnostiziert werden, wodurch diese Methode limitiert wird.

1.7.4 HIV-RNA oder p24-Nachweis bei Antikörper-negativen Patienten

Der HIV-RNA-Nachweis ist für verschiedene Fragestellungen sehr wichtig und aufgrund der immer mehr eingesetzten Methode der Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase chain reaction“, PCR) zum Erregernachweis ein oft angewandtes Mittel, um eine HIV-Infektion zu bestätigen. Die Methode birgt Fehlerquellen, die zu falsch-positiven und aber auch zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann.

Laut Diagnostikausschuss der DVV und der Gesellschaft für Virologie benötigt eine positive HIV-Diagnose daher einen serologischen Bestätigungstest.

Der Vorteil des Genomnachweises ist die Möglichkeit, mittels einer quantitativen Real-Time RT-PCR die Viruslast zu messen und so zum Beispiel im frühen Verlauf der HIV-Infektion ihren Setpoint zu bestimmen (Kapitel 1.2) oder auch den Verlauf einer Therapie beobachten und bewerten zu können.

In der Inkubationsphase vor der Serokonversion einer HIV-Infektion kann man anhand eines positiven HIV-RNA-Nachweises oder eines p24-Antigen-Nachweises eine frische HIV-Infektion labordiagnostisch feststellen. Da diese Phase nur sehr kurz ist (zwischen 10 und 20 Tagen), benötigt man jedoch eine große Anzahl an ursprünglich seronegativen Personen, um eine repräsentative Anzahl an frischen, inzidenten HIV-Infektionen zu detektieren.

In einigen Studien wurde diese Methode zur Identifizierung frischer HIV-Infektionen benutzt [98-100]. Die Nachteile dieser Methode sind die aufwendigen Teststrategien und die Kosten, da man aufgrund des sehr kurzen diagnostischen Fensters eine große Anzahl an Personen testen muss.

1.7.5 Nach-Serokonversionsteste

Methoden, die nach der HIV-Serokonversion eingesetzt werden, haben den Vorteil, dass zur Messung lediglich bereits HIV-positive Personen untersucht werden. Dazu muss vor dem jeweiligen HIV-Inzidenz-Test eine Standard-HIV-Diagnostik durchgeführt werden. Verschiedene Methoden wurden in der Vergangenheit entwickelt, um unter den seropositiven Individuen die frisch infizierten zu identifizieren.

Im Prinzip basieren alle diese Methoden entweder auf der Zunahme der HIV-spezifischen Antikörper oder auf der Zunahme der Avidität der Antikörper. Die Bestimmung, ob der Patient frisch infiziert ist, erfolgt anhand eines Grenzwertes (basierend auf den Charakteristika des jeweiligen Testes) und eines diagnostischen Fensters („window period“), welches den Zeitraum beschreibt, innerhalb dessen seropositive Personen unter dem Grenzwert des Testes bleiben. Anhand dieses diagnostischen Fensters, zusammen mit Angaben über die in der HIV-Diagnostik negative Population, lässt sich dann die jährliche Inzidenz einer Bevölkerungsgruppe pro 100.000 Menschen berechnen.

1.7.6 Serologischer Test Algorithmus für frische HIV-Infektionen

Schon im Jahr 1998 beschrieben Jansen *et al.* eine Modifikation eines kommerziellen HIV-1-Antikörper-Suchtestes der ersten Generation (HIV-1-ELISA 3A11, Abbott Laboratories), um frische Infektionen zu identifizieren [101]. Sie modifizierten den Test durch Serum-Vorverdünnungen und verkürzten die Inkubationszeiten. Grundsätzlich basierte die Idee auf der Tatsache, dass innerhalb der ersten Monate der Infektion der Antikörperspiegel an HIV-spezifischen Antikörpern steigt. Wenn seropositive Individuen in diesem weniger sensitiven Test („detuned“ ELISA, „less-sensitive“ ELISA) getestet wurden, wurden frühe Infektionen mit einem niedrigen HIV-Antikörper-Titer nicht detektiert und blieben aufgrund der Verdünnung in der modifizierten Test-Variante negativ. Der Cut-Off dieses Testes für inzidente Infektionen wurde anhand von definierten Serokonversionspaneln (Verläufe von serokonvertierten Patienten mit bekanntem oder gut abschätzbarem Infektionszeitraum) bei 129 Tagen festgelegt [101]. Da dieser Test eine Modifikation eines qualitativen Testes war, wurden Kalibratoren und Kontrollen benötigt um den Grenzwert des modifizierten Testes bestimmen zu können und den Assay zu bewerten. Diese Reagenzien wurden von der CDC zur Verfügung gestellt. Als 2003 Abbott die 3A11 ELISA-Produktion einstellte, wurde auf den Vironistatika HIV-1-ELISA (Organon Teknika) umgestellt und dieser ähnlich modifiziert [102]. Mit diesem serologischen Test-Algorithmus für frische HIV-Infektionen (STAHRS = „serological testing algorithm for recent HIV seroconversion“) wurden weltweit viele Studien durchgeführt [103-107]. Dabei zeigte sich, dass das diagnostische Fenster vom Subtyp der HIV-Infektion abhängt. Es wurde auch mehrfach beschrieben, dass bei Patienten unter Therapie und bei Patienten im AIDS-Stadium ein falsch-inzidenten Testergebnis erhalten wird [101, 108]. Dadurch entsteht eine Überschätzung der wahren Inzidenz durch den Test, was ein großer Nachteil dieses Testverfahrens ist.

1.7.7 BED-ELISA

Eine Weiterentwicklung des STAHRs ist der BED-IgG-capture ELISA (BED-ELISA), der erstmalig 2001 von Parekh *et al.* beschrieben wurde [109]. Auch dieser Test unterscheidet persistierende von frischen Infektionen aufgrund der ansteigenden Menge an HIV-spezifischen IgG-Antikörpern.

Bei diesem Sandwich-ELISA werden im ersten Schritt alle IgG-Antikörper der zu untersuchenden Probe an den Ziege-Anti-Human-IgG Fänger-Antikörper gebunden und im zweiten Schritt die Anti-HIV-1-gp41-Antikörper detektiert (Abb. 4). Hierzu wird ein spezielles Peptid verwendet, welches die immundominante Region des gp41 von drei verschiedenen HIV-1 Subtypen enthält (Subtyp B, D und CRF01_AE, früher Subtyp E genannt). So wird mit diesem ELISA der relative Anteil an HIV-1-spezifischen IgG-Antikörpern unter den gesamten IgG-Antikörpern im Serum bestimmt.

Es wurde versucht, einen Test zu entwickeln, welcher von den Herstellern der anderen HIV-Teste unabhängig ist und keine Modifikation eines bereits bestehenden Testes darstellt [109-112]. Inzwischen ist der BED-ELISA der einzige kommerzielle, für epidemiologische Studien zugelassene Test für HIV-1 Inzidenz.

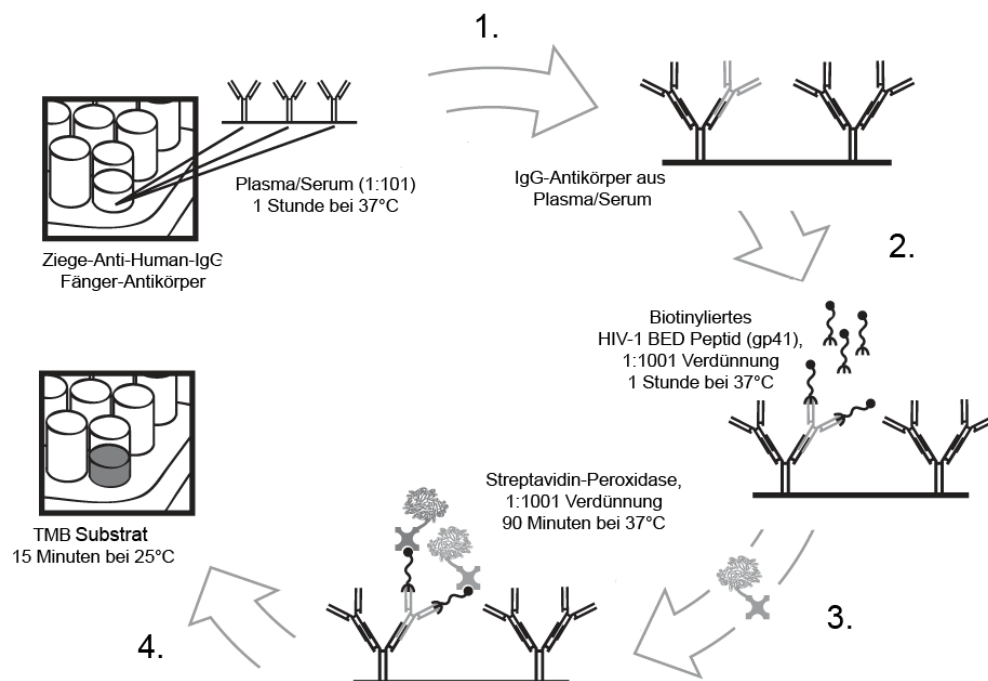


Abb. 4: Schema des BED ELISA

Mit dem an der Platte gebundenen Ziege-Anti-Human-IgG Fänger-Antikörper werden die IgG Antikörper aus der Probe an der Platte gebunden (1). Im zweiten Inkubationsschritt werden unter den gebundenen IgG-Antikörpern mit Hilfe des BED-Peptides die HIV-1 gp41 spezifischen Antikörper detektiert (2) und über eine anschließende Streptavidin-Peroxidase (3) und Substrat-Reaktion (4) im ELISA-Reader quantifiziert (Abbildung verändert nach Calypte [113]).

1.7.8 IDE-V3-ELISA

In Frankreich entwickelte die Gruppe um F. Barin einen eigenen Inzidenz-Peptid-ELISA, indem Antikörper gegen vier verschiedene Antigene gleichzeitig getestet werden [114]. Als Antigene verwendeten sie das immundominante Epitop des Hüllproteins gp41 (IDE), die dritte variable Region des gp120 (V3), rekombinant hergestellte Peptide der Integrase und rekombinantes p24-Antigen. Im aktuell eingesetzten Test werden nur noch die IDE- und V3-Antikörperantwort erfasst, da die Antikörperantwort gegen p24 individuell sehr variabel ist, vor allem bei afrikanischen Patienten. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist hier deutlich besser, wenn synthetische Oligopeptide statt langer rekombinanter Proteine eingesetzt werden [114]. Dieser Test wurde in Frankreich erfolgreich in einer nationalen Inzidenzstudie eingesetzt [115].

1.7.9 Inno-Lia

Der INNO-LIA (INNO-LIA HIV I/II Score; Innogenetics) ist ein Immunoblot, der als Bestätigungstest und zur Differenzierung von HIV-1/-2 zugelassen ist.

Bei diesem Immunoblot der zweiten Generation mit auf Nylonstreifen immobilisierten Peptiden wird die Antikörperantwort gegen verschiedene Antigene von HIV anhand des Bandenmusters und der Intensivität der einzelnen Banden bewertet. Zusätzlich kann mit diesem Test HIV-1 von HIV-2 differenziert werden, was ihn besonders in Ländern, in denen HIV-2-Infektionen häufiger auftreten, als Bestätigungstest attraktiv macht [116, 117]. Die Gruppe um Schüpbach *et al.* entwickelte mehrere Algorithmen [118], anhand derer man die Intensitäten dieser Antikörperantworten aufsummieren und für jede Probe einen Summenwert erhalten kann. Fällt dieser Wert unter einen Grenzwert, so wird die Probe als inzident bewertet. Seit 2007 wird dieser Test in der Schweiz zur Identifizierung der Neuinfektionen routinemäßig bei allen Neudiagnosen eingesetzt [119].

1.7.10 Anti-p24 IgG3-Antikörper

Eine australische Forschergruppe berichtete 2004, dass p24-spezifische IgG3-Antikörper nur in der frühen Phase einer HIV-1-Infektion gebildet werden und vier Monate nach der Infektion nicht mehr nachweisbar sind [120]. Aufgrund dieser Entdeckung wurde ein einfacher p24-IgG3-ELISA entwickelt und 17 Serokonversionspanels untersucht. 34 bis 120 Tage nach Infektion waren die p24-IgG3-Antikörper nachweisbar. Dies könnte also auch eine Methode sein, um inzidente von prävalenten Infektionen zu unterscheiden.

Allerdings sind seitdem keine weiteren Studien hierzu veröffentlicht und zum Beispiel die Ergebnisse von Barin *et al.* [114] lassen den Schluss zu, dass die individuellen Schwankungen der IgG-3-Antwort gegen das p24-Antigen zu groß sind, um ausschließlich mit dieser Methode inzidente Infektionen zu identifizieren.

1.7.11 Aviditäts-Methode

Dieser Test, erstmalig 2002 von Suligoi *et al.* [121] beschrieben, beruht auf der Antikörper-Avidität, die im ersten Jahr einer HIV-Infektion zunimmt.

Diese Methode ist für viele andere Infektionskrankheiten wie zum Beispiel Toxoplasmose, Rubella und Cytomegalovirus-Infektionen [122-124] oder auch Hepatitis B und C, Humanes Herpes Virus sechs und sieben und Varicella-Zoster-Virus beschrieben [125, 126] und wird in der medizinischen Diagnostik häufig angewandt. Die Methode von Suligoi *et al.* [121] ist ebenfalls eine Abwandlung eines kommerziellen HIV-Antikörper-Suchtestes (AxSYM HIV-1/2 gO; Abbott).

Die Probe wird in PBS-Verdünnung und in Verdünnung mit einem chaotropen Agens getestet (Guandinium-Hydrochlorid = Gu-HCl; Abb. 5).

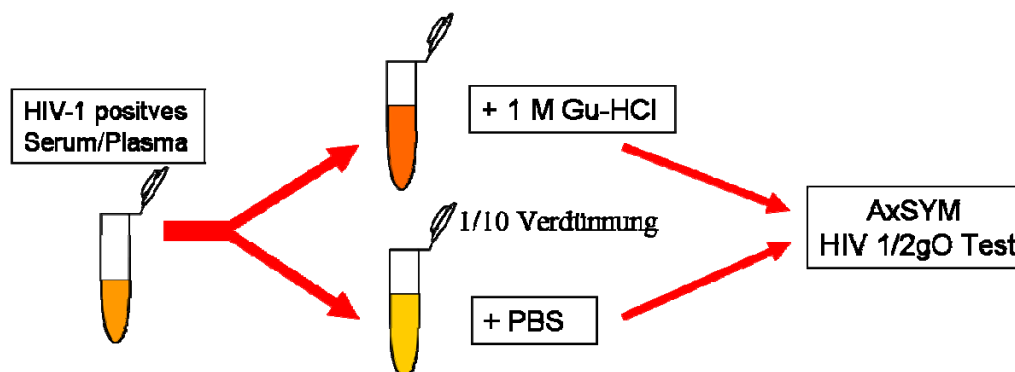


Abb. 5: Schema der Aviditäts-Methode

Bestätigt HIV-1 positives Serum oder Plasma wird entweder 1:10 in PBS oder 1:10 in Guanidinium-Hydrochlorid (1 M) verdünnt und beide Aliquots dann im AxSYM HIV-1/2 gO (Abbott) gemessen. Aus den beiden Messwerten wird der Aviditäts-Index (AI) berechnet.

Aus den Messwerten der beiden Verdünnungen wird ein Quotient gebildet, der Aviditäts-Index (AI). Je länger die Infektion zurückliegt, desto stärker binden die Antikörper und der Einfluss des Gu-HCl auf die Antigen-Antikörper-Bindung wird geringer, der AI geht gegen den Wert eins. Bei einer frischen Infektion, binden die Antikörper in Gegenwart von Gu-HCl weniger stark und der AI geht gegen null. Der HIV-1/2 gO-Test ist ein Automatentest. Dies ist einerseits von Vorteil, da nach der Verdünnung der Proben der Test vollautomatisch durchgeführt werden kann.

Andererseits kann dies auch ein Nachteil sein, da die Geräte nicht in jedem Labor vorhanden sind und die Testkosten hoch liegen. Auch diese Methode wurde schon in mehreren Studien eingesetzt [127-129].

1.7.12 Verwendung von Filter-getrocknetem Material für Studien

Der Versand von frischen Blutproben (EDTA-Blut) von HIV-positiven Patienten erfordert besondere Transportbedingungen (UN2814) und kann nicht mit jedem Transporteur erfolgen. Dieser zusätzliche Aufwand führt auch zu erheblichen Kosten. Daher stellen Filter-getrocknete Materialien eine gute Alternative dar, insbesondere in Entwicklungsländern in Afrika und Asien, wo höhere Temperaturen herrschen und eine Kühlkette aufgrund der mangelnden Infrastruktur nicht immer aufrecht erhalten werden kann. Es wurde schon früh begonnen, diverse diagnostische Laborteste auch aus auf Filter getropftem und getrocknetem Material zu etablieren [130-132]. Serologische Tests zur HIV-Diagnostik lassen sich meist problemlos auf Filtermaterial adaptieren. Dieser Entwicklung folgend wurden inzwischen auch verschiedene Inzidenz-Tests auf ihre Anwendung mit getrocknetem Filtermaterial untersucht. Bereits beschrieben ist dies für den IDE-V3-Test [114] und den BED-ELISA [113].

1.8 Aufgabenstellung

Nach dem IfSG werden in Deutschland alle positive HIV-Bestätigungsteste (HIV-Neudiagnosen) und AIDS-Fälle dem Robert Koch-Institut gemeldet. Anhand dieser Daten lässt sich der Anteil an frisch infizierten Patienten unter den Neudiagnosen nicht bestimmen. Die Kenntnis des Anteils der frischen Infektionen ist nötig, um die HIV-Inzidenz zu berechnen, da sich seit Beginn von HAART die AIDS-Fallzahlen nicht mehr für Rückrechnungsmodelle zur Berechnung der Inzidenz eignen.

Diagnostische Marker, mit denen man frische (inzidente) von länger zurückliegenden (prävalenten) Infektionen unterscheiden kann, sind daher für Untersuchungen der HIV-Inzidenz von besonderem Interesse. In der Literatur sind Methoden beschrieben, anhand derer eine solche Unterscheidung möglich ist. Grundlage dieser Methoden ist die Antikörperreifung in der frühen HIV-Infektion zur Unterscheidung zwischen einer inzidenten und einer prävalenten Infektion. Eine Methode nutzt den innerhalb des ersten Jahres nach Infektion ansteigenden IgG-Titer spezifischer HIV-Antikörper (BED-ELISA), eine weitere die zunehmende Avidität der HIV-Antikörper im Verlauf der HIV-Infektion (Aviditäts-Index).

Das Ziel dieser Arbeit war es, beide Methoden anhand eines Referenzprobenpanels von Patienten mit dokumentierter Serokonversion am RKI zu etablieren und zu validieren. Die Methode mit der besseren Sensitivität und Spezifität sollte dann in einer Pilotstudie unter Berliner HIV-Patienten zur Abklärung der Machbarkeit von Inzidenzstudien angewandt werden. Aus Voruntersuchungen und Literatur war bekannt, dass 15-20% der Proben entweder falsch-prävalent oder falsch-inzident bestimmt werden. Daher sollten wirtsspezifische Determinanten und virale Faktoren auf eine möglichen Korrelation mit den Reaktivitäten in den Inzidenztesten überprüft werden. Dazu sollten die IgG-Titer, die IgG-Subklassen, der Titer an neutralisierenden Antikörpern und Antikörperprofile gegen gp41 in ausgewählten Probenpanels charakterisiert werden. Unter den viralen Faktoren sollte die Viruslast und die Variabilität der gp41-Sequenzen auf mögliche Korrelation analysiert werden. Da die Verwendung von Filter-getrockneten Materialien den Transport von Blutproben vereinfachen würde, sollte die Stabilität der Antikörper für den Inzidenz-Test überprüft werden. Zur Durchführung einer nationalen Studie sollte außerdem die HIV-Infektiosität nach Filtertrocknung untersucht werden, um zu ermitteln, ob diese Filterproben gefahrlos verschickt werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum Verständnis des immunologischen Geschehens der frühen HIV-Infektion und der Antikörperreifung bei HIV-Infektionen beitragen und die Verbesserung der Datenlage zur HIV-Inzidenz ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Eukaryonte Zellen

Alle verwendeten eukaryonten Zellen waren mykoplasmen-frei (PCR-Nachweis).

CEMx174xSEAP Fusionsprodukt der humanen B-Zelllinie 721-174 und der humanen T-Zelllinie CEM [133]; in Aggregaten wachsende Suspensionszellen, welche leicht mit HIV infizierbar sind; zusätzlich enthalten diese Zellen ein Gen für eine humane plazentale alkalische Phosphatase unter der Kontrolle eines SIV-LTR Promotors [134]. Benötigtes Medium: RPMI Medium plus 10% FKS und 2mM L-Glutamin.

293T Humane embryonale Nierenzelle [135] mit Adenovirus Typ 5 transformiert; semiadhärentes Wachstum und gute Transfizierbarkeit; exprimiert das T-Antigen von SV40 [136]. Benötigtes Medium: D-MEM Medium plus 10%FKS und 200mM L-Glutamin.

C8166 Humane T-Zelllinie; enthält zwei defekt HTLV-1-Genome mit Deletionen im gag, pol und env Bereich [137]. Benötigtes Medium: RPMI 1640 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin.

Viren

HIV-1 NL4-3 HIV-1 Klon aus pNL4-3 hergestellt [138].
HIV-1 (4C) MN HIV-1 Laborstamm (P12).

Plasmide

pBlueskript II SK(+) (pBSSK⁺, Stratagene, GmbH); F1 (-) ori, Co1E1 ori, lacI (nicht funktionell), lacZ (für Blau-Weiß-Selektion) multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T3- und T7-Promotoren, Ampicillinresistenz, Größe: 3,0 kb.

pNL4-3 pUC18-Vektor mit proviralen HIV-1 Genom (NL4-3) flankiert von genomischer DNA, Ampicillinresistenz, Größe 14,879kb (Accession number AF324493)[138].

Bakterienstamm

XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells (Stratagene, Heidelberg); XL10-Gold strain: Tet^r $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacIqZ_M15 Tn10* (Tetr) Amy Cam^r]a.

Kulturmedien und Zusätze

Fötale Kälberserum FKS (Biochrom AG, Berlin), Dulbeccos modified Eagle Medium D-MEM, L-Glutamin 2mM, Neugeborenen Kälberserum NKS; RPMI 1640 Medium (alles Invitrogen, Karlsruhe), Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Österreich), Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung PBS (Sigma, Deisenhofen).

Oligonukleotide

Die Oligonukleotide der verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma Metabion GmbH in Martinsried synthetisiert und gereinigt und sind im Methodenteil unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

Chemikalien

Agarose (peqlab, Erlangen); Ampicillin, Ethylendiamintetraessigsäure, Magnesiumchlorid, Tris, Tween 20 (alles Sigma, Deisenhofen), Bovines Serumalbumin BSA, Calciumchlorid, Empigen BB Detergenz 30% Lösung, Guanidinium-Hydrochlorid, Kaliumchlorid, Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat (alles Merck, Darmstadt); Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg), 6x Loading Buffer, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Mass Ladder (alles Fermentas, St. Leon-Rot).

Enzyme

Taq-Polymerase, Reverse Transkriptase (Superskript II), RNasin, Amplitaq gold, Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (alles Invitrogen, Karlsruhe), Restriktionsenzyme *Hind*III, *Mun*I (alle Fermentas, St. Leon-Rot) BigDye Premix 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt).

Peptide

gp41-Peptid wurden vom National Institutes of Health (NIH) AIDS Research & Reference Reagent Program bezogen. Es wurden 85 Peptide des Panels HIV-1 Consensus Subtype B Env (15-mer) Peptides - Complete Set (Cat# 9480, Lot# 4) verwendet (Peptide 8889# bis 8973#). Es handelt sich hierbei um 15 Aminosäuren lange Peptide die jeweils um 11 Aminosäuren überlappen. Der Bereich der verwendeten 85 Peptide umfasst das gesamte HIV-1 env gp41 (Tab. 1).

Filter

Die verwendeten Filter waren eine Spezialanfertigung der Firma Whatman. In eine 85mm x 140mm x 1,6mm (H x L x B) Filterkarte aus Whatman 903 Filterpapier wurden 10 Kreise à 22mm Durchmesser in zwei Reihen vorgestanz. Zum Sterilfiltrieren der Zellkulturüberstände für die Wachstumsversuche und die Infektionsversuche wurden Filter mit einer Porengröße von 0,2µm und 0,45µm (Whatman, Dassel) verwendet.

Materialien für Zellkultur

Sterile Einwegartikel zur Zellkultur wurden von der Firma Nunc Intermed (Wiesbaden) bezogen. Alle in der Zellkultur oder für molekularbiologische Methoden verwendeten Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert.

Materialien zur ELISA-Etablierung

Peroxidase konjugierter anti-human IgG Antikörper von der Ziege und Tetramethylbenzidine (TMB) Flüssigsubstrat System für ELISA (beides von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), TROPIX ELISA-Light Kit (Tropix, Bedford, USA), Platten für den AALTO: p24-ELISA Corning Costar, 96-well Flat bottom, high binding, white Polystyrene (Corning, Bodenheim), Platten für den Peptid-ELISA: NUNC 96well flatbottom (Nunc Intermed, Wiesbaden).

Technische Geräte:

ELISA-Reader Tecan INFINITE F200, Mikrotiterplatten-Waschautomat (beide Tecan, Crailsheim), Feuchtbrutschrank, Laborzentrifuge Sorvall, Thermo Electron RC50 (alle Heraeus, Hanau), Gradientenzykler Mastercycler Gradient, Kühltischzentrifuge, Spektrometer 5417R (alles Eppendorf, Hamburg), Gelelektrophorese-Kammer Horizon 58 (Invitrogen, Karlsruhe), TaqMan ABI 7700, 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt), Videodokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 (Herolab, Wiesloch), 37°C Inkubator Schrank (Thermo Electron, Oberhausen), Heizblock (Biometra, Göttingen), Lichtmikroskop (Zeiss, Jena), Mx3005P (Stratagen, Californien, USA), IMx System Automat, AxSYM Plus Automat (alles Abbott, Wiesbaden).

Kommerzielle Test-Kits:

- Beckman Coulter HIV-1 p24 Antigen ELISA (Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA)
- HIV-1 AALTO p24-Antigen Assay (Aalto Bio Reagents, Dublin, Irland)
- Calypte HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA) und Dried Blood Spot Control Pack (Calypte Biomedical Corporation, Oregon, USA)
- HIV-1/HIV-2 III Plus für das IMx System und HIV-1/2 gO für das AxSYM System (Abbott, Wiesbaden)
- GENSCREEN HIV 1/2 Version 2 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Frankreich)
- MUREX HIV-1.2.O (Murex Biotech limited, Dartford, Großbritannien)
- HIV Blot 2.2 (MP Diagnostics; Illkirch, Frankreich)
- INNO-LIA HIV I/II Score (INNOGENETICS, Heiden)
- QIAamp Viral RNA Mini Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)
- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden)
- QIAgen DNA kit (QIAGEN, Hilden)
- Jetquick Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)
- NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren)
- BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden)
- SuperFekt Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden)
- Z-Competent *E.coli* Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Reserch, USA)
- Human IgG subclass Liquid Reagent Kit (THE BINDING SITE GmbH, Schwetzingen)

Software:

- Adobe Photoshop CS3 Extended, Version 10.0.1 (Adobe Systems Incorporation, 1990-2007)
- BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9.c (Tom Hall, 1997-2007)
- Clone Manager 9 für Windows, Professional Edition (Small Work Group License 1994-2007)
- EndNote Version X.0.2 (Thomson, 1988-2006)
- EpiCalc 2000, Version 1.02 (John Gilman und Mark Myatt, 1998, Brixton Books, Freeware)
- ImageJ, Version 1.37c (Wayne Rosband, National Institutes of helth, USA, Freeware)
- Lasergene SeqMan Pro, Version 7.2.1 (1), 410 (DNASTAR, 1989-2007)
- Magellan Software 6.4 (Tecan, Crailsheim)
- Microsoft office Packet 2003 inklusive MS Word, MS Excel, MS Powerpoint (Microsoft Corporation 1983-2003)
- MxPro – Mx3000P Version 4.01 (Stratagene 2007)
- Sequence Scanner, Version 1.0 (Applied Biosystems, 2005)

Tab. 1: gp41 Peptide und Peptidpools.

Pool	Kommentar	Nr.	Cat #	Peptid Sequenz	Pool	Kommentar	Nr.	Cat #	Peptid Sequenz
1		1	8889	EKRAVGIGAMFLGFL					
		2	8890	VGIGAMFLGFLGAAG ^{10%}					
		3	8891	AMFLGFLGAAGSTMG ^{50%}					
		4	8892	GFLGAAGSTMGAASM					
		5	8893	AAGSTMGAASMTLTV					
2		6	8894	TMGAASMTLTVQARQ	TM-Region	46	8934	VGGLIGLRIVFAVLS ^{50%}	
		7	8895	ASMTLTVQARQLLSG ^{40%}	TM-Region	47	8935	IGLRIVFAVLSIVNR ^{40%}	
		8	8896	LTVQARQLLSGIVQQ	TM-Region	48	8936	IVFAVLSIVNRVRQG ^{30%}	
		9	8897	ARQLLSGIVQQNNL	TM-Region	49	8937	VLSIVNRVRQGYSPL ^{10%}	
		10	8898	LSGIVQQQNNLLRAI ^{10%}	6	50	8938	VNRVRQGYSPLSFQT	
		11	8899	VQQQNNLLRAIEAQQ		51	8939	RQGYSPLSFQTRLPA	
		12	8900	NNLLRAIEAQQHLLQ		52	8940	SPLSFQTRLPA PRGP	
		13	8901	RAIEAQQHLLQLTVW ^{30%}		53	8941	FQTRLPA PRGPDRPE	
		14	8902	AQQHLLQLTVWGIKQ		54	8942	LPAPRGPDRPEGIEE	
		15	8903	LLQLTVWGIKQLQAR		55	8943	RGPDRPEGIEEEEGGE	
3	VERY	16	8904	TVWGIKQLQARVLAV		56	8944	RPEGIEEEGGERDRD	
	VERY	17	8905	IKQLQARVLAVERYL		57	8945	IEEEGGERDRDRSGR	
	BED	18	8906	QARVLAVERYLKDQQ		58	8946	GGERDRDRSGRLVDG	
	BED	19	8907	LAVERYLKDQQLGI		59	8947	DRDRSGRLVDGFLAL	
	BED	20	8908	RYLKDQQLLGIWGCS	7	60	8948	SGRLVDGFLALIWD*	
	BED	21	8909	DQQLLGIWGCSGKLI		61	8949	VDGFLALIWDRLSL*	
	BED	22	8910	LGIWGCSGKLICTT ^{10%}		62	8950	LALIWDRLSLCLFS*	
	BED	23	8911	GCSGKLICTTTVPWN		63	8951	WDDLRLSLCLFSYHRL	
	BED	24	8912	KLICTTTVPWNASWS		64	8952	RSLCLFSYHRLRDL	
	BED	25	8913	TTTVPWNASWSNKS		65	8953	LFSYHRLRDLILLIVT	
4		26	8914	PWNASWSNKSLEIW*		66	8954	HRLRDLILLIVTRIVE	
		27	8915	SWSNKSLEIWDNMT		67	8955	DLLIVTRIVELLGR ^{50%}	
		28	8916	KSLDEIWDNMTWMEW*		68	8956	IVTRIVELLGRRGWE*	
		29	8917	EIWDNMTWMEWEREI*		69	8957	IVELLGRRGWEVLKY	
		30	8918	NMTWMEWEREIDNYT*	8	70	8958	LGRRGWEVLKYWWNL ^{20%}	
		31	8919	MEWEREIDNYTSLIY*		71	8959	GWEVLKYWWNLLQYW	
		32	8920	REIDNYTSLIYTLIE*		72	8960	LKYWWNLLQYWSQEL ^{30%}	
		33	8921	NYTSLIYTLIEESQN*		73	8961	WNLLQYWSQELKNSA	
		34	8922	LIYTLIEESQNNQKEK		74	8962	QYWSQELKNSAVSLL	
		35	8923	LIEESQNNQKEKNEQE		75	8963	QELKNSAVSLLNATA	
5	2F5	36	8924	SQNNQKEKNEQELLE*		76	8964	NSAVSLLNATAIAVA ^{30%}	
	2F5	37	8925	QEKNEQELLELDKWA		77	8965	SLLNATAIAVAEGTD*	
	2F5	38	8926	EQELLELDKWASLWN		78	8966	ATAIAVAEGTDRVIE*	
	2F5 / 4E10	39	8927	LELDKWASLWNWFDI*		79	8967	AVAEGTDRVIEVVQR	
	2F5 / 4E10	40	8928	KWASLWNWFDITNWL*	9	80	8968	GTDRVIEVVQRACRA	
	4E10 / TM-Region	41	8929	LWNWFDITNWLWYIK ^{30%}		81	8969	VIEVVQRACRAILHI	
	4E10 / TM-Region	42	8930	FDITNWLWYIKIFIM		82	8970	VQRACRAILHIPRRI	
	4E10 / TM-Region	43	8931	NWLWYIKIFIMIVGG ^{20%}		83	8971	CRAILHIPRRIRQGL	
	TM-Region	44	8932	YIKIFIMIVGGLIGL ^{60%*2}		84	8972	LHIPRRIRQGLERAL	
	TM-Region	45	8933	FIMIVGGLIGLRIVF ^{30%}		85	8973	RRIRQGLERALL	

Prozente von Acetonitril, in denen die Peptide gelöst wurden, sind angegeben, * = in Wasser mit pH 8, *² = pH 3

2.2 Studienkollektiv

Alle in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben stammen aus der Serokonverterstudie des RKI und aus der HIV-Pilot-Inzidenzstudie Berlin. In der HIV-Serokonverterstudie des RKI werden seit 1997 PatientInnen rekrutiert, um die Einflussfaktoren auf die Progression der Erkrankung, die Verbreitung der HIV-Subtypen und die Übertragung resistenter Viren in Deutschland zu untersuchen [69, 139, 140]. In der vom Bundesministerium für Gesundheit geförderten HIV-Pilot-Inzidenzstudie sollte die Evaluierung und Etablierung neuer serologischer Methoden für die Bestimmung frischer HIV-Infektionen zur Gewinnung von Daten zur HIV-Inzidenz erfolgen. Gleichzeitig wurde eine Datenerhebung zu Wissen, Einstellungen und Verhalten bezüglich HIV/AIDS (*KAB-Survey* = „*Knowledge, Attitude and Behaviour*“, „*Second Generation HIV Surveillance*“) bei Personen mit kürzlich erworbener HIV-Infektion durchgeführt. Beide Studien wurden von der Ethik-Kommission bewilligt und alle Patienten wurden von dem betreuenden Arzt über das Ziel der Studien aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

Für das Referenzprobenpanel (RPP) wurden 148 Proben von 81 bestätigt HIV-1 positiven Patienten der Serokonverterstudie ausgewählt (null bis vier Verlaufsproben pro Patient). 78 Patienten waren männlich und drei weiblich. Die Patienten hatten sich zwischen 1999 und 2005 infiziert.

Für eine Reihe der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde aufgrund des limitierten Probenmaterials entweder eine Auswahl von 28 Proben oder nur die Hälfte des Panels ($n = 74$) verwendet. In den 74 Proben sind immer auch die 28 Proben enthalten, so dass diese 28 Proben mit allen Methoden untersucht wurden. Zur Auswahl der 28 Proben siehe Kapitel 3.2..

2.2.1 Pilotstudie

In die Pilotstudie, die als Querschnittsstudie konzipiert war, wurden Patienten ab einem Alter von 18 Jahren eingeschlossen, bei denen zwischen November 2005 und Februar 2007 in Berlin die Erstdiagnose HIV gestellt wurde. Sie sollten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine AIDS-definierenden Erkrankungen aufweisen und nicht antiretroviral behandelt sein. Die Patienten wurden mit Hilfe der behandelnden Ärzte in 20 Institutionen rekrutiert (Arztpraxen bzw. Klinik- und Institutsambulanzen). Es erfolgte eine venöse Blutentnahme sowie die Erhebung demographischer Angaben und klinischer sowie anamnestischer Daten durch einen Arztfragebogen.

Die Patienten selbst füllten einen Patientenfragebogen zu Wissen, Einstellungen und Verhalten in Bezug auf HIV/AIDS und den entsprechenden Infektionsrisiken aus (KAB-Survey). Die Datenerhebung war anonym und unverbunden. Die Blutproben wurden am RKI aufgearbeitet (2.3.1) und mit dem BED-ELISA untersucht (2.3.4).

2.2.2 Kommerzielles Probenpanel

Das speziell für HIV-1 Inzidenz-Teste kommerziell erhältliche Probenpanel (BBI PRB 601; Seracare, Milford, USA) bestand aus 15 HIV-1 positiven Seren. Diese wurden aus 78 Proben von 51 Plasmaspendern ausgewählt. Die 78 Proben wurden in fünf verschiedenen Laboren mit neun verschiedenen Methoden zur Inzidenz-Bestimmung getestet. Es wurden die 15 für das BBI-Panel ausgewählt, die übereinstimmende Ergebnisse in allen Testen, unter anderem auch im BED-ELISA, lieferten. Acht der Proben waren übereinstimmend als chronisch infiziert klassifiziert worden und sieben Proben übereinstimmend als inzident. Dieses Panel (n = 15) diente als Kontroll-Panel zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit publizierter Ergebnisse mit dem BED-ELISA.

2.2.3 Verwendeter Konzentrationsstandard

Als Konzentrationsstandard für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde aus einem NL4-3-Virusstock in negativem humanem Plasma eine serielle Verdünnungsreihe in 1:10er Schritten hergestellt (von $6,8 \times 10^8$ Genomkopien/ml bis 6,8 Genomkopien/ml) und bei -70°C portioniert gelagert. Für die Filterlagerversuche wurden diese Aliquots auf Eis aufgetaut, 30µl pro Filter getropft und die Filter über Nacht in der Laminarflow getrocknet. Es wurden jeweils zwei Filterscheiben pro zu untersuchenden Zeitpunkt zur Doppelwertbestimmung bei Raumtemperatur (20°C bis 22°C), -20°C und -70°C gelagert.

2.3 Serologische Methoden

2.3.1 Probenaufarbeitung und Lagerung

Die Patientenproben wurden nach der Blutabnahme bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden an das RKI geliefert. Pro Patient sollten zwei mal 10ml EDTA-Blut geschickt werden. Das EDTA-Blut wurde für 10min bei 2600g und Raumtemperatur abzentrifugiert, die obere Schicht Plasma abgenommen, in 500µl oder 1ml Portionen aliquotiert und bei -70°C gelagert. Ein Aliquot wurde bei 4°C bis zur Untersuchung und anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.2 Anfertigung der Filterproben

Jeweils 30µl des Plasmas wurden auf 903 Whatman Filterpapier über Nacht getrocknet. Dann wurden sie in Plastiktüten verpackt und bei Raumtemperatur trocken gelagert. Zum Eluieren der Proben wurden die einzelnen Filterscheiben in 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und mit 450µl des Elutionspuffers (3% NKS, 0,05% TWEEN20 in PBS) entweder über Nacht bei 4°C oder 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler eluiert. Das gewonnene Filtereluat entsprach einer 1:15 Verdünnung des Ausgangsmaterials und wurde sowohl für die beiden HIV-Antikörpersuchteste (HIV ELISA), als auch für den Western Blot und den BED-ELISA verwendet.

2.3.3 HIV-1-ELISA

Als HIV-1-ELISA der dritten Generation wurden der MUREX HIV-1.2.O und der Genscreen HIV1/2 nach Herstellerangaben eingesetzt. Mit dem HIV-1/HIV-2 III Plus ELISA wurde im IMx-Automaten die Aviditäts-Methode getestet. Die Aviditäts-Methode auf dem AxSYM-Automaten mit den AxSYM HIV-1/2 gO Test wurde im Labor Dr. Berg in Berlin durchgeführt (Aviditäts-Index siehe 2.3.5).

2.3.4 BED-ELISA

Der HIV-1 BED-ELISA wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (siehe Abb. 4 in Kapitel 1.7.7). Es dürfen nur bestätigt HIV-positive Proben im BED-ELISA eingesetzt werden. Die Proben sollten einmal gemessen werden. Alle Proben mit einer normalisierten optischen Dichte (OD_n) unter 1,2 sollen dann wiederholt im Dreifachansatz gemessen werden. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurde abweichend von den Herstellerangaben jede Probe in zwei unabhängigen Testdurchläufen gemessen und der Mittelwert der beiden Messwerte als Messergebnis gewertet. Diese Vorgehensweise wurde von dem Entwickler dieses Testes als adäquat angesehen (B. Parekh, per Email bestätigt). Für die Messungen der Filterproben wurden die Filtereluat eingesetzt. Für die Kalibrierung der Messwerte der Filterproben wurde der Kalibrator ebenfalls auf Filter getropft (30µl), getrocknet und wie die Filterproben behandelt.

2.3.5 Aviditäts-Index

Die ersten Untersuchungen zum Aviditäts-Index (AI) wurden mit dem IMx-Automaten und dem Test HIV-1/HIV-2 III Plus ELISA (Mindestvolumen 150µl) am RKI durchgeführt.

Spätere Untersuchungen wurden mit dem Test AxSYM HIV-1/2 gO (Mindestvolumen 220µl) auf den AxSYM-Automaten im Labor Berg durchgeführt. Für die Ermittlung des AI nach Suligoi müssen die Proben ebenso wie für den BED-ELISA bestätigt HIV-seropositiv sein [121].

Die Proben wurden 1:10 mit PBS bzw. 1:10 in dem chaotropen Agens Gu-HCl verdünnt. Das jeweilige Endvolumen wurde entsprechend des benötigten Mindestvolumens des verwendeten Testes eingestellt. Beide Aliquots wurden parallel getestet und aus den erhaltenden Messwerten wurde ein Quotient gebildet, der den AI darstellt (Übersicht siehe Abb. 5 in Kapitel 1.7.11).

AI = Messwert des Gu-HCl Aliquot / Messwert des PBS-Aliquot

Wenn das Messergebnis in der Gu-HCl Verdünnung im HIV-1/2 gO einen Grenzwert ($S/CO = \text{sample/Cut-off}$) unter 1 aufwies, wurde die Probe negativ bewertet und es konnte von dieser Probe kein AI gebildet werden. Dies wurde bei Patientenproben mit noch sehr kurz zurückliegender Serokonversion beobachtet.

2.3.6 p24-Antigentest

Messung des HIV-Antigens p24 im Beckmann Coulter Antigen-Test

Der kommerzielle Beckman Coulter HIV-1 p24 Antigen-ELISA hatte einen linearen Messbereich von 7,5pg bis 125pg/ml. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

AALTO p24-Antigentest

Da Beckmann Coulter die Produktion des p24-Antigentestes im Verlauf der Untersuchungen einstellte, wurde ein Inhaus-p24-Antigentest etabliert. Dazu wurden die Platten zunächst mit Anti-p24-Antikörpern beschichtet. Das Beschichten der Platten sowie die Testdurchführung erfolgte nach den Angaben von AALTO [141].

Für die Quantifizierung des p24-Kapsidproteins aus Zellkulturüberständen wurden die im p24-Antigen ELISA gemessenen relativen Lichteinheiten (RU) normiert und zwei unabhängige Verdünnungsreihen zur Erstellung der Eichgeraden eingesetzt. Der lineare Meßbereich lag zwischen 0,078ng/ml und 10ng/ml Um die Auswertung im linearen Bereich zu gewährleisten, wurden Zellkulturüberstände nach Bedarf verdünnt in den p24-Assay eingesetzt (1:100 bzw. 1:400).

2.3.7 Peptid-ELISA

Verwendete Peptide

Für den Peptid-ELISA wurde das Peptid-Panel des HIV-1 Env gp41 Proteins nach Angabe des Herstellers gelöst.

Einige Peptide mussten erst in Acetonitril verschiedener Konzentration gelöst werden (10% bis 80%, Tab. 1); der überwiegende Teil wurde in Wasser gelöst. Die gelösten Peptide wurden aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

Zum Beschichten der Platten wurden die Peptide zu einem Fünferpool (Peptid 8889 bis 8893) und acht Zehnerpools vereinigt. Hierbei wurden die Peptide 8894 bis 8973 aufsteigend in Gruppen eingeteilt (Tab. 1) und dann die Pools mit NaHCO₃-Puffer (100mM, pH = 9,6) auf eine Endkonzentration von 5ng/μl eingestellt.

Beschichten der Platten

Zum Beschichten der Platten wurden die Peptide entweder in den Pools oder als Einzelpeptide mit 100μl der Peptidlösungen beschichtet (5ng/μl). Die Peptidlösung wurde auf die Platten gegeben und die Platten bei 37°C für 18-24 Stunden inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde auf jeder Platte eine Reihe Wells mit einer 10%igen NKS-Lösung in NaHCO₃-Puffer (100mM, pH = 9,6) beschichtet. Gleichzeitig diente die Negativ-Kontrolle zur Normierung der Messwerte. Nach 12-16 Stunden Inkubation wurden die Platten mit PBS gewaschen (Waschprogramm AALTO 08) und mit 300μl Blockierungspuffer (10% NKS in PBS) befüllt, abgeklebt und bei -20°C weggefroren. Die Platten wurden maximal 6 Monate gefroren gelagert.

Testdurchführung

Als Grundlage wurde ein Protokoll verwendet, das in der Arbeitsgruppe zur Untersuchung einer HIV-Transportdomäne auf gp120 etabliert worden war [142]. Als Waschpuffer wurde PBS eingesetzt. Die Platten wurden aufgetaut und gewaschen (Waschprogramm AALTO 08). Die Seren wurden 1:100 in PBS mit 10% NKS verdünnt und je 100μl pro Well pipettiert. Die Platte wurde abgeklebt und 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut gewaschen (Waschprogramm 2xAALTO 08). Nun wurde die Konjugatlösung (100μl pro Well), in einer 1:30.000 Verdünnung in PBS und 10% NKS eingesetzt, die Platten abgeklebt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Arbeitsverdünnung des Konjugat-Antikörpers (Maus-Anti-Human-IgG Antikörper) war zuvor optimiert worden. Nach Inkubation mit dem Konjugat wurde nochmals gewaschen (Waschprogramm 2xAALTO 08) und 100μl TMB-Substratlösung pro Well eingesetzt. Nach 15min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100μl Schwefelsäure (1N) gestoppt. Die OD wurde im ELISA Reader bei 450nm (Referenz 620 nm) bestimmt.

Berechnung der ODn*

Um die Reaktivitäten der Seren untereinander vergleichen zu können, mussten sie normiert werden.

Nach dem Test wurden die Messwerte der NKS-beschichteten Wells (Reaktion gegen nicht relevante Proteine) von den Messwerten der Antikörper-Reaktionen gegen die Peptid-Pools oder Einzelpeptide subtrahiert und so aus der Optischen Dichte (OD) eine normierte OD_n* berechnet.

Waschprogramme am Waschautomaten Tecan

Programm AALTO 08: Jedes Well wurde zweimal mit je 200µl pro Well gewaschen und am Ende wurden die Wells leer gesaugt und trocken geklopft.

Programm 2xAALTO 08: Jedes Well wurde viermal mit je 200µl pro Well gewaschen und am Ende wurden die Wells leer gesaugt und trocken geklopft.

2.3.8 Immunoblot-Analysen mit dem HIV Blot 2.2

Der HIV Blot 2.2 Western Blot (WB) wurde nach Herstellerangaben (MP Diagnostics) durchgeführt. Zur Ermittlung des Aviditäts-Indexes für die verschiedenen Antigene im WB wurde das Protokoll leicht modifiziert. Im ersten Inkubationsschritt wurde der Blot-Puffer 1:10 mit einer 1 molaren Gu-HCl Lösung verdünnt. Danach wurden die Streifen wie im Protokoll vorgeschrieben behandelt. Nach Beendigung der Farbreaktion wurden die WB-Streifen eingescannt und mit der ImageJ Software die Intensität der Banden in Relativen Einheiten (RU) berechnet. Da auf jedem WB-Streifen die Serumkontrolle (SK) integriert ist, konnte die jeweilige Bandenintensität der Antigen-Antwort auf die SK normiert werden. Hierzu wurde der RU-Wert der SK gleich 100% gesetzt und das Verhältnis der jeweiligen Bande der WB-Streifen zur SK berechnet. Mit diesen normalisierten RU konnte dann der WB Aviditäts-Index (WB-AI) pro Probe und pro Antigen berechnet werden (2.3.5).

2.3.9 IDE-V3-ELISA

Die Messungen der Plasma- und Filterproben des Serokonverter RPP erfolgten in einer Kooperation mit Francis Barin im französischen Referenzlabor für HIV in Tours [114]. Im IDE-V3-ELISA wird die Antikörperreaktivität gegen eine Mischung aus zwei immundominanten Epitopen des gp41 (IDE, Konsensussequenz aller HIV-1 Subtypen und der Konsensussequenz des Subtyp D) und gegen eine Mischung aus V3-Loop-Peptiden des gp120 (fünf Konsensussequenzen der Subtypen A, B, C, D und CRF01_AE) gemessen. Die Reaktivität der Proben gegen IDE und V3 wird dazu genutzt, um die Wahrscheinlichkeit (W), dass die Probe von einem frisch Infizierten stammt, zu ermitteln.

Dazu wurde von Barin *et al.* 2005 anhand eines Etablierungspanels folgende Formel zur Berechnung von *W* erstellt:

$$W = \exp(-1,14433 + 0,06079 * IDE.r + 0,02977 * V3.r) / [1 + \exp(-1,14433 + 0,06079 * IDE.r + 0,02977 * V3.r)]$$

Hierbei steht IDE.r für die Antikörperreaktivität gegen das IDE-Peptid und V3.r für die Antikörperreaktivität gegen die V3 Peptid-Mischung [114].

2.3.10 IgG-Subklassen Bestimmung

Die Bestimmungen des IgG-Gesamtgehaltes der Proben und der IgG-Subklassen wurden in einem medizinischen Diagnostik Labor in Berlin (Labor 28) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem Behringer BNII Analyser und dem Human IgG Subclass Liquid Reagent Kit gemessen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

500µl Plasma (-70°C) wurden in ein auf Eis aufgetaut und zur Entfernung von Kryopräzipitat mit 2600g für 10min bei 4°C zentrifugiert. 450µl Überstand wurden in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und zur Viruspelletierung mit 17000g für 90min bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme von 310µl Überstand wurde aus den verbleibenden 140µl entsprechend dem Protokoll des viralen RNA-Kits (Qiagen) weiterverfahren. Die RNA wurde in 60µl Elutionspuffer eluiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die Extraktion der RNA aus Filterproben wurden die getrockneten Filterproben unter der Laminarflow in 1,5ml Eppendorfröhrchen überführt und 140µl RNase freies Bidest. Wasser hinzugegeben. Diese wurden dann bei 4°C auf einem Schüttler für eine Stunde zur Rehydratisierung inkubiert. Anschließend wurden die 140µl mitsamt dem Filter auf eine QIAGEN Säule überführt und die RNA entsprechend des Standardprotokolls vom Hersteller extrahiert. Lediglich bei den Zentrifugationsschritten wurde bei 8500g statt 8000g zentrifugiert. Vor dem letzten Elutionsschritt wurde der Filter vorsichtig von der Säule entfernt und die Säule mit 60µl Elutionspuffer eluiert.

2.4.2 Transformation ultrakompetenter *E. coli* XL10-Gold

Die Transformation ultrakompetenter *E. coli* XL10-Gold mit Plasmid DNA erfolgte nach dem Transformationsprotokoll von Stratagene. Es wurden pro Ansatz 75µl der kompetente Zellen verwendet.

2.4.3 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung des pNL4-3 in Mini- (NucleoSpin® Plasmid) und Maxi-Maßstab (EndoFree Plasmid Maxi Kit) erfolgte anhand der Protokolle der Hersteller.

2.4.4 Restriktionsanalyse des pNL4-3

Zur Überprüfung der Integrität des Plasmids wurde ein Restriktionsverdau mit *HindIII* und *MunI* entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.4.7) analysiert.

2.4.5 Synthese von cDNA aus RNA

Bei der cDNA-Synthese wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase „Superscript II“ (RNA-abhängige DNA-Polymerase) eine RNA-Sequenz in die komplementäre Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die extrahierte RNA für 10min bei 65°C denaturiert und dann in die RT-Reaktion mit dem antisense-Primer der anschließenden PCR eingesetzt.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgt mittels des Enzyms Polymerase eine DNA-Doppelstrang-Vervielfältigung. Grundsätzlich gibt es drei Phasen der PCR, die Denaturierungsphase, die Primerhybridisierung und die Elongation. Die verwendeten Temperaturen, vor allem der Primerhybridisierung, hingen von den eingesetzten Primern ab. Die Sequenzen der verwendeten Primer und die jeweiligen Temperaturprogramme sind in der zitierten Literatur angegeben.

Mykoplasmen-PCR

Die Zellkulturüberstände wurden vor der PCR für 5min bei 95°C im Wasserbad inkubiert, zentrifugiert und der Überstand 1:10 in Bidest. Wasser verdünnt, bevor er in die PCR eingesetzt wurden [143]. Mit dieser PCR wurde ein 270bp-Fragment der Mykoplasmen-DNA nachgewiesen.

MNO-gp41-PCR

Die MNO-gp41-PCR war eine genestete RT-PCR, bestehend aus oder cDNA-Synthese und einer anschließenden genesteten PCR. Für die cDNA-Synthese wurde der antisense Primer der äußeren PCR verwendet. Mit dieser PCR wurden 148 Aminosäuren (AS) (444bp) der HIV-1 *env* gp41 Region amplifiziert [144].

Inhaus-*pol* RT-PCR

Die Inhaus-*pol* RT-PCR war eine semi-nested-PCR mit vorhergehender cDNA-Synthese und anschließender semi-nested-PCR, mit der ein 1453bp großes

Fragment, welches für die virale Protease (99AS) und 303AS der Reversen Transkriptase kodiert, unter der Verwendung des Expand High Fidelity PCR System amplifiziert wurde [69, 145].

2.4.7 Agarose-DNA-Gelelektrophorese

Analytische und quantitative Gelelektrophorese

Die DNA-Proben (2µl aus den PCR-Ansätzen, 0,5-1µg aus den Restriktionsverdau) wurden mit 6fach Ladepuffer gemischt und elektrophoretisch bei 5-10V/cm in 0,8 bis 2%igen Agarosegelen in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente in 1xTAE Puffer mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA wurde ein Größenstandard (1kb Ladder) mit aufgetrennt. Für die quantitative Bestimmung wurde ein Konzentrationsstandard (Mass Lader) eingesetzt. Die Agarosegele wurden anschließend mit Hilfe des Videodokumentationssystems E.A.S.Y.RH-3 nach Banden-Visualisierung mit UV-Licht (366nm) fotografiert und ausgewertet [146]. Durch Vergleich des Bandenmusters mit den Größen- und Konzentrationsstandards konnten die Größen der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt und die Menge quantifiziert werden.

2.4.8 Quantitative Real-time PCR (TaqMan)

Über eine Real-Time PCR wurde mit einer FAM-TAMRA Sonde oder mit einer FAM-BHQ Sonde (TM-LTR_2: 5'-FAM-TCTGAGGGATCTCTAGYTACCAGAGT-TAMRA/BHQ-3') und den verwendeten Primern (LTR_524_s: 5'-CTCAATAAAGCTTGCCTTG-3', LTR-625_as: 5'-GCGCCACTGCTAGAGAT-3') die Viruslast bestimmt. In dieser PCR wurde ein 150bp langes Fragment aus dem LTR-Bereich amplifiziert. Die PCR wurde mit dem ABI PRISM-7700-Sequence Detector und später aufgrund eines Gerätewechsels mit dem MXpro-3004 quantitativ durchgeführt. Mit dem Wechsel auf den MXpro-3004 mußte auch die TAMRA gequenchte Sonde durch eine Sonde mit einen „Black Hole Quencher“ (BHQ) ersetzt werden. Anhand des in Doppelwerten mitgeführten Konzentrationsstandards (2.2.3) konnte mit der jeweiligen Gerätesoftware die quantitative Auswertung erfolgen.

2.4.9 Sequenzanalyse

Es wurde eine „cycle-sequencing“-Reaktion nach Sanger [147] durchgeführt. Hierbei wurde die Sequenz so lange amplifiziert, bis ein Didesoxynukleotid (ddNTP) eingebaut und die Reaktion terminiert wurde. Die unterschiedlich farbmarkierten ddNTPs befanden sich dann jeweils am 3'-Ende des terminierten PCR-Produktes,

wodurch nach elektrophoretischer Auftrennung und Fluoreszenzanregung durch einen Laser die Basenabfolge ermittelt werden konnte. Es wurde mit dem BigDye Premix 3.1 gearbeitet.

Nach Ablauf der PCR wurden die Proben bei -20°C eingefroren und vom hauseigenen Sequenzierungs-Service durch Gelfiltration aufgereinigt und auf dem 3130xL Genetic Analyzer analysiert. Die erzeugten Elektrophoretogramme wurden mittels der Programme Sequenz Scanner, Lasergene SeqMan Pro und dem BioEdit Sequence Alignment Editor ausgewertet.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryonter Zelllinien

Humane Zelllinien wurden in 25- oder 75cm^2 -Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO_2 im Feuchtbrutschrank kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage 1:10 passagiert. Hierfür wurden adhärenente 293T-Zellen in 3ml PBS gewaschen, zur Ablösung der Zellen vom Boden der 25- bzw. 75cm^2 -Zellkulturflasche mit 0,5ml bzw. 1ml Trypsin/EDTA für 2 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, in einem kleinen Volumen Vollmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, wo sie in 8ml bzw. 12ml frischem Vollmedium kultiviert wurden. Die Passage der CEMx174xSEAP-Suspensionszellen erfolgte bei $\frac{1}{2}$ Mediumwechsel mit oder ohne Zentrifugation und $\frac{1}{5}$ Aufteilung der Zellen. Die Zellen wurden in einem Volumen von 10ml in 25cm^2 - bzw. 20ml in 75cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Türk-Zählkammern (Tiefe 0,100mm) mit 10 μl Zellsuspension. Infizierte Zellen wurden zuvor durch eine 1:10 Verdünnung mit 1%iger Essigsäure inaktiviert.

2.5.2 Virusherstellung und Vermehrung

Für die NL4-3 Virusproduktion musste zuerst das Plasmid pNL4-3, welches das komplette HIV-1 NL4-3 Genom trägt, in 293T-Zellen transfiziert werden. Um eine größere Menge an Virus zu erhalten, wurden die Viren in CEMx174 Zellen vermehrt. Nach der Ernte des Zellkulturüberstandes wurde der infektiöse Titer $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bestimmt (TCID = „tissue culture infectiouse dose“).

Transfektion in eukaryonte 293T-Zellen

293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 25cm^2 -Flasche in 8ml Vollmedium (DMEM + 10% FKS + 2mM L-Glutamin) ausgesät. Die pNL4-3-Plasmide wurden im TE-Puffer auf 200ng/ μl verdünnt. Pro Ansatz wurden 2,5 μg (12,5 μl) Träger-DNA (pBSSK⁺) und 2,5 μg (12,5 μl) endonuklease-freies pNL4-3 (Maxi-Präparation) mit 125 μl Vollmedium und 30 μl SuperFect gemischt.

Das Medium wurde von den 40-60% konfluenten Zellen abgenommen und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen.

Nachdem das PBS vorsichtig von den Zellen abgesaugt worden war, wurde zu dem Plasmid-SuperFect-Komplex 1ml Vollmedium hinzugegeben, mit der Pipette leicht gemischt, vorsichtig auf die Zellen getropft und danach die Flaschen geschwenkt, damit die Zellen gleichmäßig benetzt wurden. Dieser Ansatz wurde für 3h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Superfect-Mix von den Zellen abgenommen, die Zellen mit 1ml PBS gewaschen und in 8ml Vollmedium für 48h inkubiert.

Zur Ernte des Virus wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, mit 300g bei 4°C für 10min zentrifugiert und auf Eis aliquotiert. Alle Arbeiten mit infektiösem Virus erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank auf Eis. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert. Zur Vermehrung des HIV-1 NL4-3 wurden, ausgehend von diesen geernteten Virusstocks, CEMx174xSEAP Zellen infiziert und drei Tage inkubiert. Bei einem zytopathischen Effekt (CPE) in 60 bis 80% der Zellen wurde geerntet und der Zellkulturüberstand portioniert bei -70°C weggefroren.

2.5.3 Virustitration

Der infektiöse Titer der Virusstocks wurde in serielle Verdünnungen in einer Endpunkttitration nach Kärber/Spearman auf CEMx174xSEAP-Zellen bestimmt. Der Nachweis der Virusvermehrung erfolgte mit Hilfe des HIV-1 p24-Antigen-ELISA.

Auf 96-Loch-Platten wurden 180µl des 1:10 verdünnten Virusstocks für eine Vierfachbestimmung ausplattiert und 1:3 über 12 Verdünnungsstufen in 120µl vorgelegtem Vollmedium auf Eis verdünnt und dann für 10min auf Raumtemperatur aufgewärmt, wobei auf eine gleiche Dauer bei Raumtemperatur für alle Verdünnungen geachtet wurde. Zu jedem Ansatz dieser Verdünnungsreihe wurden 100µl einer Zellsuspension mit 5×10^3 CEMx174xSEAP-Zellen gegeben und 7 Tage bei 37°C inkubiert.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Anschließend wurden alle Proben ab der letzten Verdünnungsstufe im p24-Antigen-ELISA getestet, bei der noch in allen Parallelansätzen ein CPE erkenntlich war.

Der qualitative Nachweis des Kapsidproteins p24 zur Definition des Endpunktes der Titration erfolgte mittels des HIV-1 p24-Antigen-ELISA (2.3.6).

Der Ursprungs-Virusstock hatte einen infektiösen Titer von $9,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml, der Virusstock, der für weitere Untersuchungen verwendet wurde, erreichte nach weiteren Passagen in CEMx174xSEAP einen von Titer $3,1 \times 10^5$ TCID₅₀/ml.

Die $TCID_{50}/ml$ wurde mit folgender Formel berechnet [148]:

$$\text{Log } TCID_{50} = L - d (S - 0,5)$$

wobei L = log. der ersten Verdünnungsstufe auf der Platte

d = Verdünnungsfaktor seriell {3}

S = Anzahl positiver Kulturen

Diese Formel ist abgeleitet von der originalen Formel von Spearman und Kärber:

$$TCID_{50} / ml = \chi^2 + \frac{d}{2} - d \sum_{i=0}^K h_i$$

X_K = höchste Verdünnung, bei der in allen Ansätzen eine Infektion nachgewiesen wurde
 d = Verdünnungsfaktor
 $\sum_{i=0}^K h_i$ = Summe der Anteile an positiven Ansätzen der jeweiligen Verdünnung

2.5.4 Messung des Zellwachstums mit/ohne Filtereluate

Das Zellwachstum CEMx174xSEAP Zellen wurde in einer 24-Loch-Platte in An- und Abwesenheit von Filterscheiben bestimmt. Hierzu wurden die Filterscheiben vorher durch autoklavieren sterilisiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Türk-Zählkammer. Zudem wurde der Effekt von Filtereluates bestimmt. Dazu wurden Filter in RPMI Vollmedium für eine Stunde inkubiert, das Medium mit einem 0,2µm Filter steril filtriert und in verschiedenen Verdünnungen (1:1; 1:3; 1:5; 1:7; 1:10) jeweils als Doppelbestimmung zu 2×10^4 Zellen/Loch gegeben und alle 24h die Zellzahl bestimmt.

2.5.5 Bestimmung der HIV-Infektiosität nach Filtertrocknung

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 100µl des Virusstocks ($9,5 \times 10^4$ $TCID_{50}$) auf die Filterscheiben getropft (96h, 72h, 48h, 24h, 12h, 0h). Die Filter wurden in 1ml Medium für 1h bei 4°C eluiert und das Eluat danach durch einen 0,45µm Filter sterilfiltriert und 1:3 mit Vollmedium verdünnt. Für den 0h-Wert wurde nach 20min, nachdem der Virusstock in den Filter eingezogen war, eluiert. Es wurden 1×10^6 CEMx174xSEAP Zellen in 200µl Vollmedium ausgesät und mit 200µl des verdünnten Eluates infiziert. Die Zellen wurden bei 37°C für 1 1/2 Stunden inkubiert. Im ersten Versuchsansatz wurde dann auf 1ml aufgefüllt. Im zweiten Ansatz wurde das Inokulum durch 3x Waschen entfernt und die Zellen auf 1ml aufgefüllt.

Die Zellen wurden über 14 Tage visuell kontrolliert und am Tag 4, 7, 10, 12 und 14 Überstände abgenommen. Wenn nötig, wurde das Medium gewechselt oder es wurden neue Zellen hinzugegeben. Im zweiten Versuchsansatz wurden die Überstände sofort auf neuen Zellen passagiert und ebenfalls über 14 Tage hinweg visuell kontrolliert und Überstände abgenommen. Alle Überstände wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C gelagert oder sofort weiterpassagiert.

2.5.6 Neutralisationstest

Der Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Stephen Norley (P12; RKI) bestimmt. Für diesen Test wurden auf 96-Loch-Platten vierfach-Ansätze einer Verdünnungsreihe der Plasmaproben in Medium hergestellt (8-, 16-, 32-, 64-, 128-, 256-, 512-, 1024-fach). Von den Verdünnungen wurden 10µl pro Verdünnung mit 10µl Virus (HIV-1 (4C) MN; TCID₅₀ = 50) gemischt und für eine Stunde inkubiert. Dann wurden 2×10^3 C8166 Zellen hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Löcher mit 160µl Vollmedium aufgefüllt und für 8 Tage inkubiert.

Anschließend wurden diese Überstände im p24-Antigentest gemessen um die Anzahl der p24-positiven und negativen Kulturen bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das Virus ohne Plasma und als Negativ-Kontrolle ein HIV-negatives humanes Serum eingesetzt.

Der Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde entsprechend wie der infektiöse Virustiter nach Spearman/Kärber berechnet. Es wurde eine serielle Verünnungsreihe an Plasma und ein konstantes Virusinokulum eingesetzt und statt der Summe der Anteile an positiven Kulturen die Summe der Anteile der negativen Kulturen als Kenngröße mit der Formel berechnet (2.5.3).

2.6 Statistik

Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewert

Für die Bewertung der Sensitivität und der Spezifität der Inzidenz-Teste wurde die Vierfeldertafel (Tab. 2) benutzt. Für die Berechnungen wurde positiv = inzident und negativ = prävalent gesetzt. Die Aussage, ob es sich bei dem berechneten Infektionszeitpunkt um ein richtig-inzidentes oder ein falsch-inzidentes Ergebnis handelt, wurde anhand des Serokonverter-Probenpanels getroffen, das durch sehr genau eingegrenzte Infektionszeiträume charakterisiert ist (vgl. Ergebnissteil 3.1).

Tab. 2: Diagnostische Vierfeldertafel (verändert nach Harms 1992 [149])

Diagnose (nach Testergebnis):	Tatsächlicher Infektionszeitpunkt:		
	positiv (inzident)	negativ (prävalent)	
positiv (inzident)	richtig-positiv (richtig-inzident) A	falsch-negativ (falsch-inzident) B	positiver Vorhersagewert $A / (A+B)$
negativ (prävalent)	falsch-negativ (falsch-prävalent) C	richtig-negativ (richtig-prävalent) D	negativer Vorhersagewert $D / (D+C)$
	Sensitivität $A / (A+C)$	Spezifität $D / (D+B)$	

Positiver Vorhersagewert (positiver prädiktiver Wert = PPV)

PPV = Wahrscheinlichkeit, dass ein positiv getesteter Patient infiziert ist

Negativer Vorhersagewert (negativer prädiktiver Wert = NPV)

NPV = Wahrscheinlichkeit, dass ein negativ getesteter Patient nicht infiziert ist

Adjustierung des Anteils inzidenter Proben in der HIV-Inzidenz-Pilotstudie anhand der prädiktiven Werte

Für den BED-ELISA wurde eine optimale Sensitivität und Spezifität von 80% bzw. 86% gemessen (bei 0,8 ODN und einem Zeitfenster von ≤ 20 Wochen). Da diese Werte im Vergleich zur Standard-HIV-Diagnostik niedrig liegen, wurde eine Adjustierung anhand des gemessenen Anteils für frische HIV-Infektionen in der HIV-Inzidenz-Pilotstudie durchgeführt.

Da Sensitivität und Spezifität des BED-CEIA in der Studienpopulation nicht bekannt waren, musste von der Annahme ausgegangen werden, dass diese in der Studienpopulation ähnlich sind wie in der bekannten Population des Referenzprobenpanels. Dies ist eine Annahme, welche berechtigterweise kritisiert werden kann. Allerdings waren die Sensitivität und die Spezifität bzw. der positive und negative Vorhersagewert des Testes berechnet über das Referenzprobenpanel die einzig bekannten Größen, anhand derer eine Adjustierung möglich war.

Für die Adjustierung wurde vom gemessenen Inzidenzanteil der Anteil der falsch-inzident gemessenen Proben abgezogen und der Anteil der falsch-prävalenten hinzugefügt. Zugrunde liegt dieser Adjustierung eine Erweiterung der Bayes'schen Formel bei unbekannter Häufigkeit der Eigenschaft in der Population [149]. Dadurch ergibt sich folgende Gesamtformel für die Berechnung des korrigierten Inzidenzanteils:

$$I(k) = \frac{[I(g)^2 \times \text{Sens}] : [I(g) \times \text{Sens} + P(g) \times (1 - \text{Spez})] + P(g) - [P(g)^2 \times \text{Spez}] : [(P(g) \times \text{Spez}) + I(g) \times (1 - \text{Sens})]}$$

I (k) korrigierter Inzidenzanteil
I (g) gemessene Inzidenzanteil
Sens Sensitivität des Testes
Spez Spezifität des Testes
P (g) gemessene Prävalenz

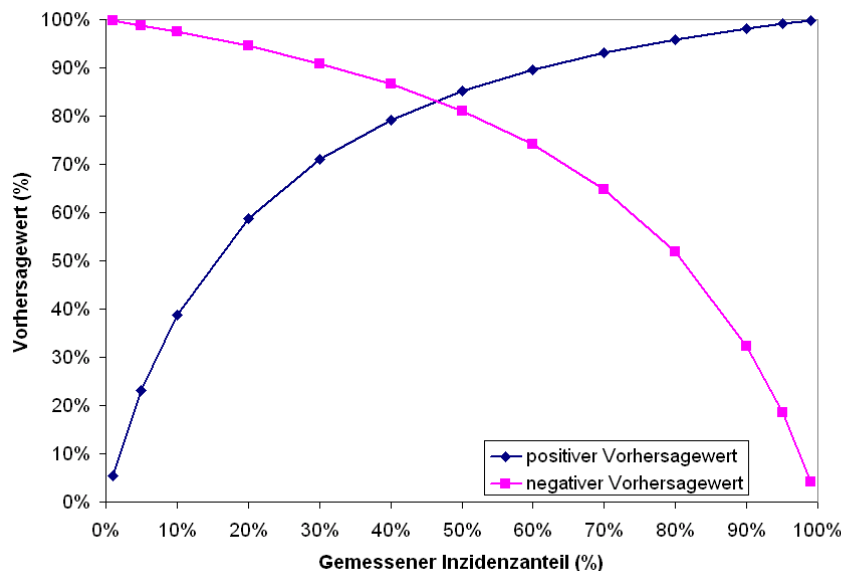


Abb. 6: Abhängigkeit des prädiktiven Wertes von dem gemessenen Inzidenzanteil

Bei dieser Berechnung wurde der positive prädiktive Wert, der vom Inzidenzanteil abhängig ist, benutzt (Abb. 6). Bei einem gemessenen Anteil inzidenter Infektionen von < 42% ergibt sich demzufolge eine Korrektur nach unten und bei entsprechenden Werten von > 42% eine Korrektur nach oben. Diese Korrektur kann jedoch nur bei epidemiologischen Analysen eingesetzt werden, in denen der Anteil inzidenter Infektionen in einer Population ermittelt wird; individuelle Testergebnisse können mit dieser Methode nicht überprüft und korrigiert werden [150].

Konfidenzintervall und weitere Statistik

Das 95% Konfidenzintervall (KI[95%]) wurde auf der Grundlage der Verteilung und der Stichprobengröße nach Fleiss *et al.* mit EpiCalc 2000 berechnet [151].

Für den Vergleich von zwei Variablen (zum Beispiel Sensitivitäten oder Spezifitäten) von zwei unabhängigen Verteilungen mit gegebener Verteilung und Stichprobengröße wurden das 95% Konfidenzintervall und die kritische Ratio Z nach Fleiss *et al.* berechnet [151].

Um den p-Wert für Z zu berechnen wurde die Methode zur rationellen Annäherung benutzt (beschrieben von Abramowitz und Stegun [152]) und basierend auf dem in Cooke *et al.* beschriebenen Algorithmus angewendet [153].

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Aspekte zur Verbesserung der Datenlage zur HIV-Inzidenz in Deutschland untersucht. Zunächst wurden verschiedene HIV-Inzidenz-Teste anhand eines definierten Referenzprobenpanels validiert. Nach der Auswahl und Etablierung eines geeigneten Testes wurden virale und wirtsspezifische Determinanten untersucht, um Ansatzpunkte zu finden, mit denen die Sensitivität und Spezifität der Teste verbessert werden können. Zeitgleich wurde die HIV-Inzidenz-Pilotstudie durchgeführt. Zur Vorbereitung einer nationalen Inzidenz-Studie wurden Antikörper- und Genomnachweise an Filter-getrockneten Plasmaproben validiert.

3.1 Etablierung der HIV-Inzidenz-Teste

Für epidemiologische Studien sind Methoden zur HIV-Inzidenz-Bestimmung publiziert, mit denen eine Berechnung der HIV-Inzidenz innerhalb einer gegebenen Bevölkerung ermöglicht wird. Die meisten Inzidenzteste basieren auf dem Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern, da diese innerhalb des ersten Jahres einer HIV-Infektion im Titer ansteigen und ihre Avidität zunimmt [101, 154, 155]. Der BED-ELISA verwendet zur Unterscheidung den Titer an spezifischen Antikörpern [111] und die Aviditäts-Methode die Antikörper-Avidität [121]. In dieser Arbeit sollten beide Methoden studienbegleitend etabliert und miteinander verglichen werden, um die Methode zu ermitteln, die zur Durchführung einer Inzidenzstudie am Besten geeignet war.

3.1.1 Charakteristika des Referenzprobenpanels

Zur Validierung serologischer Methoden wurde ein geeignetes Referenzprobenpanel (RPP) aus der Probenbank der HIV-Serokonverterstudie des RKIs zusammengestellt. Unter den Patienten, bei denen der Zeitpunkt der Serokonversion und somit die Dauer der Infektion bis zum Blutentnahmedatum bekannt war, wurden die Patienten nach folgenden Kriterien ausgesucht:

- Zeitabstand zwischen dem letzten schriftlich bestätigten negativen HIV-Test und dem ersten schriftlich bestätigten positiven HIV-Test von maximal drei Monaten (dokumentierte Serokonverter; n = 9) oder Vorliegen eines ersten reaktiven Testes (akute Serokonverter mit bestätigt positiver Verlaufsprüfung; n = 72)
- Therapie-naiv zum Zeitpunkt der Probennahme
- Keine AIDS-definierenden Symptome zum Zeitpunkt der Probennahme
- HIV-1 Subtyp B Infektion (*pol*-Subtyp)

Insgesamt umfasste das RPP 148 Plasmaproben von 81 Patienten mit ein bis vier Verlaufsproben pro Patient. Als Zeitpunkt der Infektion zur Berechnung der Dauer der Infektion wurde entweder das Blutentnahmedatum des ersten reaktiven Testes genommen oder das arithmetische Mittel zwischen dem letzten negativen und dem ersten positiven Testdatum (Blutentnahmedatum). Dieser Zeitpunkt der Infektion wurde als die beste Annäherung an den tatsächlichen Infektionszeitpunkt angenommen. Insgesamt umfasste das Panel null bis 220 Wochen Dauer der Infektion. 73 Proben wurden innerhalb der ersten sechs Monate der Infektion entnommen und 75 Proben nach sechs Monaten. Von 63 Patienten waren Labordaten zur CD4⁺-Zellzahl und zur Viruslast vorhanden.

Als inzidente Kontrolle wurde eine Plasmaprobe ausgewählt, die 12 Wochen nach Infektionszeitpunkt abgenommen wurde. Dieses Plasma stammte von einem Plasmaspender (UB-Plasma), von dem genügend Material vorhanden war, so dass es als interne Kontrolle in allen Testläufen verwendet werden konnte. Als prävalente Kontrolle wurde eine Verlaufsprobe eines Patienten ausgewählt, der schon mehrere Jahre HIV-1 positiv und therapie-naiv war (190 Wochen Infektionsdauer). Zusätzlich wurde das kommerzielle Probenpanel BBI PRB 601 verwendet. Dieses Panel besteht aus 15 Seren und wurde speziell zur Etablierung und Vergleichbarkeit von HIV-Inzidenz-Testen von BBI zusammengestellt.

3.1.2 Sensitivität und Spezifität des BED-ELISA

Der einzige, direkt für HIV-Inzidenz-Teste entwickelte ELISA ist der kommerzielle BED-ELISA von Calypte Biomedical. Aufgrund eines guten Preis-Leistungs Verhältnisses und einer einfachen Handhabung wurde dieser Test ausgewählt und anhand des RPP die Sensitivität und Spezifität des Testes überprüft. Für das inzidente Kontrollplasma wurde im Mittel über alle Läufe eine ODn von 0,04 ($\pm 0,01$) gemessen. Für das prävalente Kontrollplasma ergaben sich im Mittel eine ODn von 2,35 ($\pm 0,45$). Anhand der Messwerte des RPP im BED-ELISA wurden die Cut-Off-Werte definiert. Die optimale Sensitivität war 80% (KI[95%]: 68-89) bei einer Spezifität von 86% (KI[95%]: 76-92).

Diese Werte wurden bei einer ODn von 0,8 und einer Dauer der Infektion von 20 Wochen erreicht. Bei diesen Cut-Offs lagen 65 Proben des RPP unterhalb einer Infektionsdauer von 20 Wochen (inzident), während 83 Proben über 20 Wochen Dauer der Infektion lagen (prävalent).

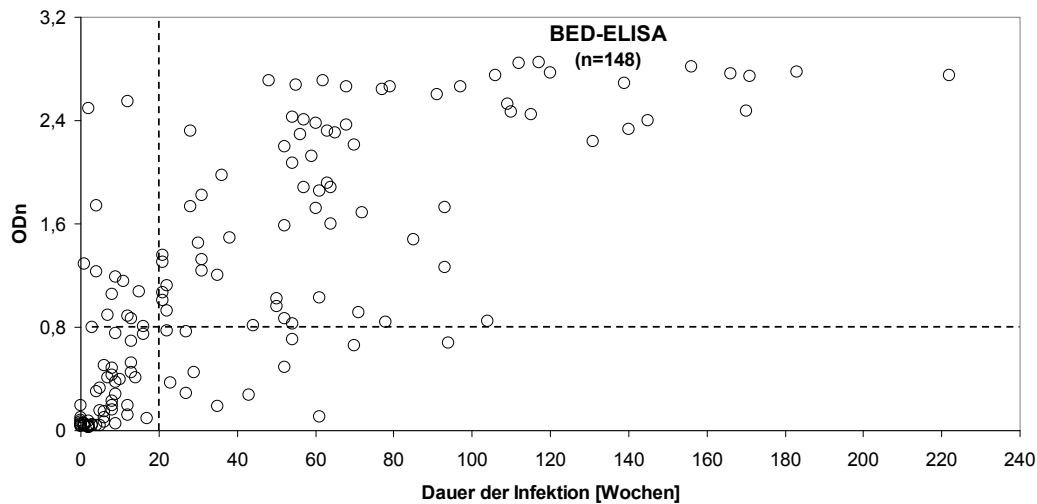


Abb. 7: Reaktivität (ODn) im BED-ELISA in Abhängigkeit der Infektionsdauer

MW der Doppelbestimmung der 148 Proben des RPP, die gestrichelten Linien zeigen die Cut-Off-Werte für die optimale Sensitivität und Spezifität an (ODn = 0,8; Dauer der Infektion = 20 Wochen).

Von den 65 wahr-inzidenten Proben des RPP wurden 52 richtig-inzident und 13 falsch-prävalent gemessen (Abb. 7 und Abb. 8). Von den 83 wahr-prävalenten Proben wurden 12 falsch-inzident gemessen. Insgesamt wurden 25 Proben (16,8%) falsch bestimmt. Der positiv prädiktive Wert für den BED-ELISA lag bei 81% und der negativ prädiktive Wert bei 85%. Diese Werte sind für eine individuelle Diagnostik zu niedrig, aber für eine epidemiologische Populationsstudie ausreichend.

Die Messungen des BBI-Probenpanels zeigten, dass die Literaturdaten sehr gut reproduziert werden konnten (Tab. 3). Die größte Abweichung zwischen den Literaturwerten und den Messwerten trat hierbei bei der Probe BBI PRB 14 auf (0,651 Abweichung)[156].

Diese Abweichung wurde durch mehrere Messungen in verschiedenen Läufen überprüft und wurde immer bestätigt. Insgesamt kam es aber nur zu einer mittleren Abweichung von 0,1 ODn über alle 15 Proben.

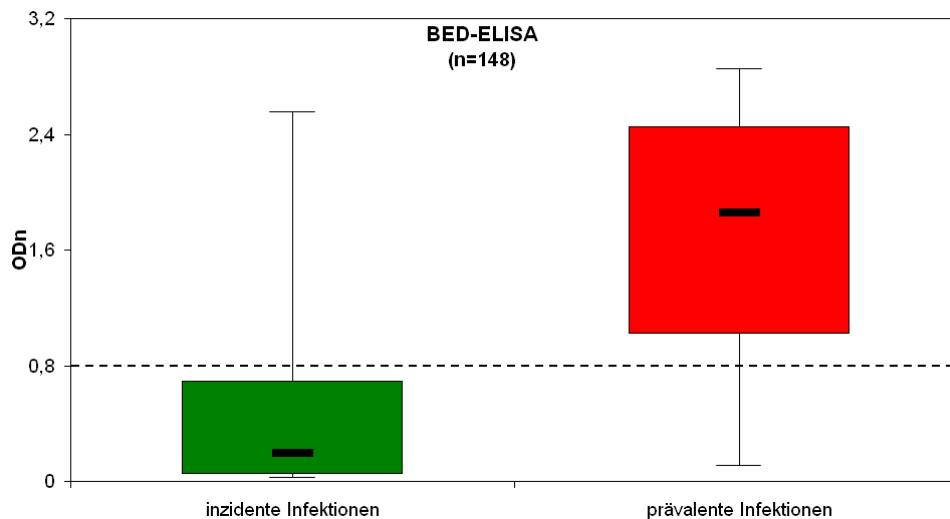


Abb. 8: Differenzierung inzidenter und prävalenter Infektionen anhand des BED-ELISA

Boxplots: Die Boxen zeigen die 25 bis 75% Quartile und der Balken in den Boxen den Median der inzidenten bzw. prävalenten Infektionen, die minimalen und maximalen Werte sind durch die Linien an den Boxen dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Cut-Off von 0,8 ODn. Inzidente Infektionen \leq 20 Wochen Dauer der Infektion, prävalente Infektionen $>$ 20 Wochen Dauer der Infektion.

Tab. 3: Das Probenpanel BBI PrB 601 und die Messwerte im BED-ELISA im Vergleich

	BBI / BED		RKI / BED	
	ODn Wert	Definition laut BBI	ODn Wert	Abweichung
PrB 01	0,364	Inzident	0,246	0,118
PrB 02	0,132	Inzident	0,066	0,066
PrB 03	1,091	Prävalent	1,091	0
PrB 04	1,412	Prävalent	1,397	0,015
PrB 05	0,332	Inzident	0,275	0,057
PrB. 06	1,171	Prävalent	1,168	0,003
PrB. 07	0,239	Inzident	0,167	0,072
PrB. 08	2,994	Prävalent	3,10	0,109
PrB. 09	0,436	Inzident	0,395	0,041
PrB. 10	3,078	Prävalent	3,07	0,007
PrB. 11	1,213	Prävalent	1,237	0,024
PrB. 12	0,345	Inzident	0,264	0,081
PrB. 13	3,034	Prävalent	3,05	0,014
PrB. 14	0,743	Inzident	0,092	0,651
PrB. 15	1,683	Prävalent	1,487	0,196
MW				0,097
STABW				0,162

3.1.3 Sensitivität und Spezifität der Aviditäts-Methode

Eine andere Methode zur Unterscheidung frischer von chronischen Infektionen ist die Bestimmung des Aviditäts-Indexes (AI) nach der Methode von Suligoi *et al.* (2002), welche mittels einer Modifikation eines HIV-ELISA der dritten Generation - AxSYM HIV-1/2 gO - eine Unterscheidung zwischen inzidenten und prävalenten HIV-Infektionen zeigen konnten [121].

Ein Halbautomat, der IMx-Automat, ein Vorgänger des AxSYM-Automaten, war im RKI Labor vorhanden. Mit diesem wurden die ersten Versuche durchgeführt. Der HIV-1/HIV-2 III Plus Test ist für die HIV-Diagnostik zugelassen; die Ausführung zur AI-Bestimmung stellt jedoch eine Abweichung vom validierten und zugelassenen Standardprotokoll dar. Es wurde in Vorversuchen untersucht, ob es möglich ist, die Aviditäts-Methode für zwei im Labor verwendete HIV-ELISA zu adaptieren (MUREX HIV-1.2.O von Abbott/Murex; Genscreen HIV1/2 von Biorad). Zudem wurden verschiedene chaotrope Agenzien ausgetestet [157].

Hier konnte gezeigt werden, dass Harnstoff in hohen Konzentrationen eingesetzt werden musste, um mit Gu-HCl vergleichbare AIs zu erreichen. Außerdem zeigten die Vorversuche, welche an einem weiteren, kleineren Probenpanel durchgeführt wurden, dass die Sensitivität und die Spezifität der modifizierten ELISA Genscreen und Murex mit 40% bis 70% nicht ausreichend waren [157], so dass die besten Ergebnisse im IMx mit Guandidium-Hydrochlorid erzielt wurden.

Der IMx-Automat war jedoch im Probendurchsatz pro Lauf limitiert. Daher wurde die Aviditäts-Methode im Rahmen der Promotion im AxSYM-Automaten mit dem AxSYM HIV-1/2 gO Test in Kooperation im Medizinischen Labor Dr. Berg (Berlin) durchgeführt. Von fünf Proben konnte der AI nicht berechnet werden (alle mit null bis zwei Wochen Infektionsdauer), da sie durch Verdünnung in Gu-HCl einen Grenzwert ($S/CO = \text{sample/Cut-off}$) unter 1 im AxSYM HIV-1/2 gO Test erreichten und damit als negativ bewertet wurden. Zur Berechnung der Sensitivität und der Spezifität wurden diese Proben als richtig-inzident gemessen bewertet. Das UB-Plasma als inzidente Kontrolle lag im Mittel über alle Läufe bei einem AI von 0,24 ($\pm 0,04$) und die prävalente Kontrolle immer im Mittel bei einem AI von 0,99 ($\pm 0,05$). Die besten Werte für die Sensitivität und Spezifität für den AI wurden bei Cut-Off-Werte von 20 Wochen Dauer der Infektion und einen AI von 0,8 ermittelt (Abb. 9). Dies führte genau wie beim BED-ELISA zu einer Einteilung des RPP von 65 wahr-inzidenten Proben (≤ 20 Wochen Dauer der Infektion) und 83 wahr-prävalenten Proben (> 20 Wochen Dauer der Infektion) des RPP.

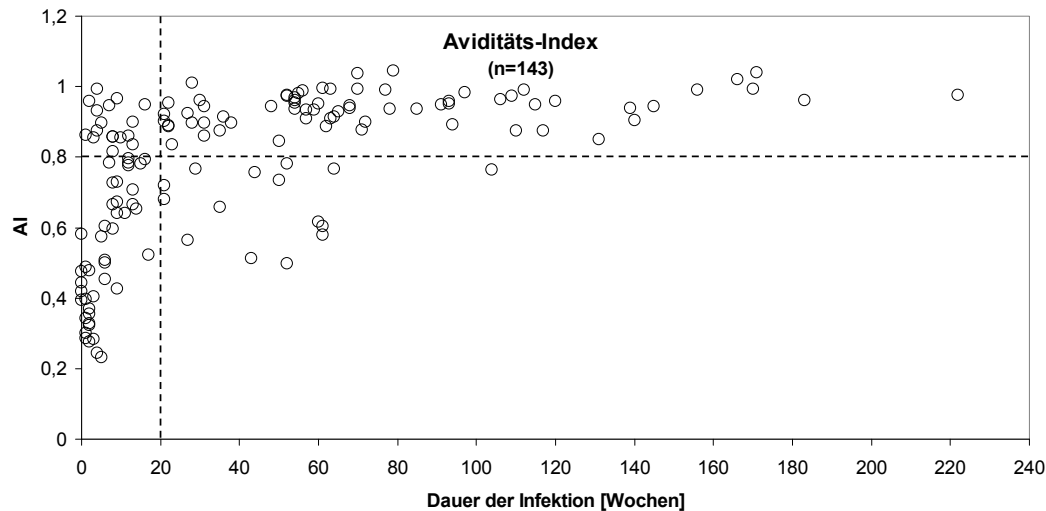


Abb. 9: Der Aviditäts-Index in Abhängigkeit der Infektionsdauer

MW der Doppelbestimmungen von 143 Proben des RPP, die gestrichelte Linien zeigen die Cut-Off Werte für die beste Sensitivität und Spezifität an (AI = 0,8, Dauer der Infektion = 20 Wochen). 5 inzidente Proben sind nicht gezeigt, da ihre Reaktivität im Gu-HCl Aliquot negativ war und ihr AI nicht berechnet werden konnte.

Mit den Cut-Off-Werten (OD = 0,8 und 20 Wochen) erreichte dieser Test eine Sensitivität von 74% (KI[95%]: 62-84) und eine Spezifität von 82% (KI[95%]: 72-89). Hier lag der prädiktive Wert bei 76% (positiv) und 80% (negativ). Auch diese Werte genügen für eine epidemiologische Studie. Es wurden insgesamt 32 Proben (21,6%) falsch bestimmt (17 falsch-prävalent; 15 falsch-inzident; Abb. 9 und Abb. 10).

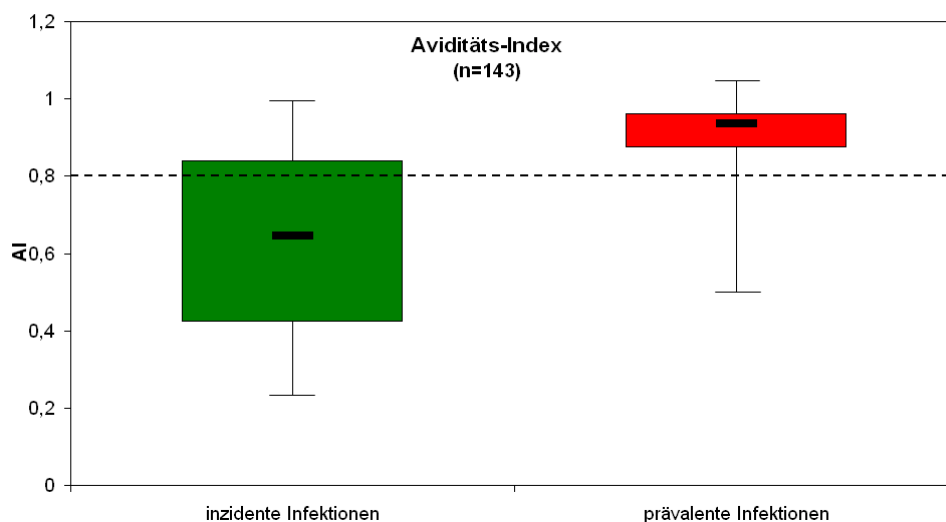


Abb. 10: Differenzierung inzidenter und prävalenter Infektionen anhand des Aviditäts-Indexes

Boxplots: Die Boxen zeigen die 25 bis 75% Quartile und der Balken in den Boxen den Median der inzidenten bzw. prävalenten Infektionen, die minimalen und maximalen Werte sind durch die Linien an den Boxen dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Cut-Off von 0,8 AI. Inzidente Infektionen \leq 20 Wochen Dauer der Infektion, prävalente Infektionen $>$ 20 Wochen Dauer der Infektion. 5 inzidente Proben sind nicht gezeigt, da ihre Reaktivität im Gu-HCl Aliquot negativ war und ihr AI nicht berechnet werden konnte.

3.1.4 Vergleich der Sensitivität und Spezifität im BED-ELISA und Aviditäts-Index

Vergleicht man Sensitivität und Spezifität beider Teste miteinander, schneidet keiner der beiden Teste signifikant besser ab als der andere (Sensitivität $p = 0,53$; Spezifität $p = 0,67$; Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des BED-ELISA und der Aviditäts-Methode

	BED-ELISA ¹		Aviditäts-Index ¹		
	n = 148 ¹	KI[95%]	n = 148 ¹	KI[95%]	p
Sensitivität	80%	(68-89)	74%	(62-84)	0,53
Spezifität	86%	(76-92)	82%	(72-89)	0,67

¹ RPP; Cut-Off für die Dauer der Infektion 20 Wochen; 0,8 ODn für den BED und 0,8 AI für die Avidität

Insgesamt wurden mit der Aviditäts-Methode jedoch weitere sieben Proben falsch bestimmt im Vergleich zum BED-ELISA (32 zu 25).

Von den 65 Proben ≤ 20 Wochen des RPP wurden 45 von beiden Methoden als richtig-inzident erkannt und 10 von beiden als falsch-prävalent bestimmt (Tab. 5; Abb 11). Drei Proben wurden hier nur vom BED-ELISA als falsch-prävalent gemessen und sieben durch die Aviditäts-Methode.

Von den 83 Proben > 20 Wochen wurden 62 Proben von beiden Methoden richtig-prävalent und sechs von beiden als falsch-inzident gemessen. Hier wurden sechs Proben nur vom BED-ELISA als falsch-inzident gemessen und neun durch die Aviditäts-Methode (Tab. 5; Abb 11).

Tab. 5: Übersicht über die Anzahl der inzident bestimmten Proben des RPP mit dem BED-ELISA und der Aviditäts-Methode

Gruppen	Anzahl der Proben	Anzahl der inzident bestimmten Proben durch:		
		BED-ELISA	Aviditäts-Index	Beide Methoden
≤ 20 Wochen (inzident)	65	52	48	45
> 20 Wochen (prävalent)	83	12	15	6

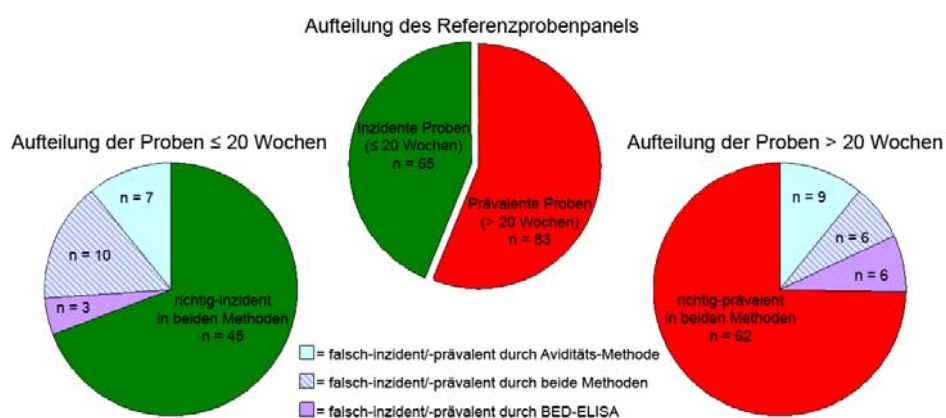


Abb 11: Grafische Übersicht über die Verteilung der inzidenten und prävalenten Proben-Ergebnisse in den verschiedenen Inzidenz-Methoden

Diese Ergebnisse unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant zu den jeweiligen Ergebnissen aus der Literatur von Suligoi *et al.* (2002) und Parekh *et al.* (2002) (Parekh $p = 0,9$ Sensitivität und $p = 0,47$ Spezifität; Suligoi $p = 0,18$ Sensitivität und $p = 0,47$ Spezifität; Tab. 6 und Tab. 7, [111] [121]).

Tab. 6: Vergleich der BED-ELISA Ergebnisse mit Literaturdaten

	RKI RPP ¹		Parekh <i>et al.</i> ²		
	n = 148	KI[95%]	n = 622	KI[95%]	p
Sensitivität	80% [74%]	(68-89) [62-83]	82%	(77-86)	0,90 [0,17]
Spezifität	86% [86%]	(76-92) [75-92]	89%	(85-92)	0,47 [0,50]

¹ Dauer der Infektion 20 Wochen; ² Dauer der Infektion 155 Tage (≈ 22 Wochen)

In [] stehen die Werte für das RPP mit den Cut-Off-Werte von Parekh *et al.* (2002) berechnet (0,8 ODn und 22 Wochen Dauer der Infektion)

Tab. 7: Vergleich der AI Ergebnisse mit Literaturdaten

	RKI RPP ¹		Suligoi <i>et al.</i> ²		
	n = 148	(95%KI)	n = 216	(95%KI)	p
Sensitivität	74% [68%]	(62-84) [56-79]	88%	(71-96)	0,18 [0,06]
Spezifität	82% [83%]	(72-89) [72-90]	86%	(80-91)	0,47 [0,58]

¹ Dauer der Infektion 20 Wochen; ² Dauer der Infektion 6 Monate (≈ 24 Wochen)

In [] stehen die Werte für das RPP mit den Cut-Off-Werte von Suligoi *et al.* (2002) berechnet (0,8 AI und 24 Wochen Dauer der Infektion)

Wenn man für die Bewertung des RPP die publizierten Cut-Off-Werte für die Dauer der Infektion von Parekh (155 Tage ≈ 22 Wochen) und Suligoi (sechs Monate ≈ 24 Wochen) einsetzt, wird eine geringere Sensitivität und die Spezifität erreicht, allerdings ist der Unterschied zu den publizierten Daten wieder nicht signifikant (Tab. 6 und Tab. 7). Beide Teste sind nach diesen Resultaten für individuelle Diagnostik nicht geeignet, aber für eine epidemiologische Studie ausreichend.

3.1.5 Sensitivität und Spezifität des IDE-V3-ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der von Barin *et al.* (2005) beschriebene IDE-V3-ELISA als weitere Methode zur Inzidenz Bestimmung mit dem RPP getestet [114]. Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Francis Barin wurden jeweils Plasma und zwei Filter mit getropften Plasma pro Probe der 148 Proben des RPP zur Untersuchung an das französische HIV-Referenz-Labor (Tours, Frankreich) geschickt, und dort im IDE-V3-ELISA gemessen. Mit dem dort etablierten Cut-Off von 24 Wochen (sechs Monaten) und einer Wahrscheinlichkeit für eine inzidente Infektion (W) von 0,5 wurde eine niedrige Sensitivität von 36% bei einer hohen Spezifität von 99% erreicht. Es wurde insgesamt zwar nur eine Probe des RPP als falsch-inzident gemessen, aber auch nur 26 von 73 wahr-inzidenten Proben (also ≤ 24 Wochen Dauer der Infektion) des RPP als richtig-inzident erkannt (Abb. 12).

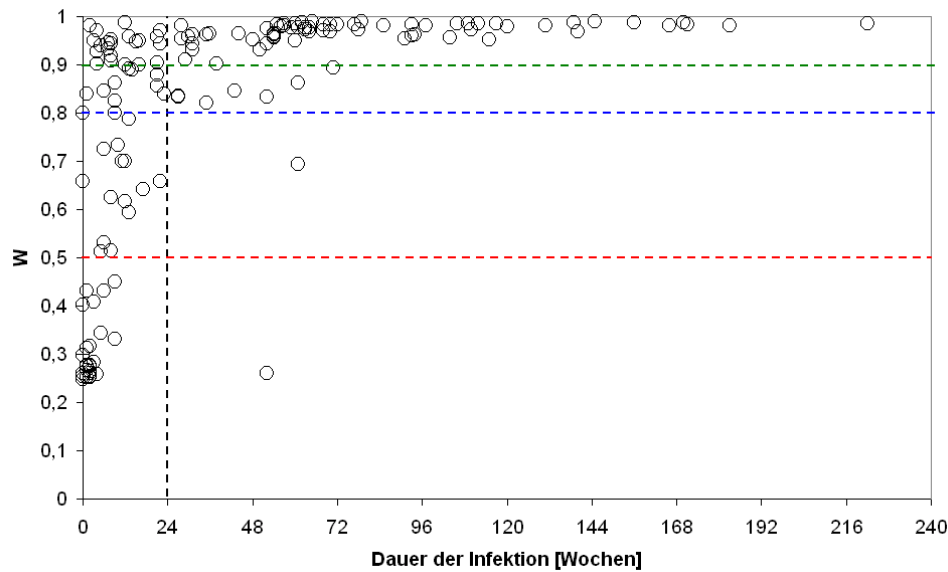


Abb. 12: Inzidenz im IDE-V3-ELISA in Abhängigkeit der Infektionsdauer

Die schwarze gestrichelte senkrechte Linie: Cut-Off für die Dauer der Infektion bei 24 Wochen; Horizontale rote gestrichelte Linie: Cut-Off für inzident bei $W = 0,5$ wie von Barin *et al.* (2005) publiziert; Horizontale blaue gestrichelte Linie bei $W = 0,8$; Horizontale grüne gestrichelte Linie bei $W = 0,9$.

Die optimale Sensitivität und Spezifität bei 24 Wochen Dauer der Infektion mit den Messdaten des RPP erreichte man mit einem Cut-Off von $W = 0,9$ mit 73% Sensitivität und 88% Spezifität. Den größten Effekt für die Erhöhung der Sensitivität (56%) bei gleichzeitig immer noch hoher Spezifität (96%) erzielte man mit einem Cut-Off von $W = 0,8$. Die Unterschiede zu 20 Wochen Dauer der Infektion als Cut-Off waren nicht signifikant (Tab. 8).

Tab. 8: Sensitivität und Spezifität des RPP bei verschiedenen Cut-Off-Werte im IDE-V3

Cut-Off IDE-V3	20 Wochen Dauer der Infektion		24 Wochen Dauer der Infektion	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
$W = 0,5^{\#}$	40%	99%	36%	99%
$W = 0,8^{\#}$	62%	96%	56%	96%
$W = 0,9^{\#}$	75%	84%	73%	84%

[#]W = Wahrscheinlichkeit für inzident; p-Werte nicht angegeben (alle > 0,1)

3.2 Charakterisierung der falsch-klassifizierten Proben

Wie schon in der Literatur für den BED-ELISA und der Aviditäts-Methode beschrieben, zeigte auch die Validierung der beiden Inzidenz-Teste anhand des RPP, dass ein Teil der Proben falsch klassifiziert wurden. Es sollte überprüft werden, ob diese falsch-reaktiven Proben eine Gemeinsamkeit aufwiesen oder ob es andere Parameter gab, anhand derer eine frische Infektion von einer chronischen Infektion unterschieden werden konnte. In weitergehenden Untersuchungen wurden die Proben des RPP im Hinblick auf verschiedene Wirts- und virologische Determinanten untersucht, die für eine unterschiedliche Antikörperantwort verantwortlich sein könnten. Für viele Untersuchungen wurde ein Probenpanel aus 28 Proben stellvertretend für die vier Reaktionskategorien zusammengestellt, da das Probenmaterial limitiert war. Hierbei handelt es sich um eine Auswahl von jeweils sieben richtig-inzident bestimmten Proben (RI1 bis RI7), sieben richtig-prävalent bestimmten Proben (RP1 bis RP7) und jeweils sieben im BED und mit der AI Methode falsch-inzident (FI1 bis FI7) sowie falsch-prävalent bestimmte Proben (FP1 bis FP7). Bei den FI klassifizierten Proben stimmten nur sechs Proben in beiden Testen überein, daher ist die Probe FI7 richtig-prävalent im AI gemessen worden (Tab. 9).

Tab. 9: 28er Probenpanel: Ergebnisse im BED-ELISA und AI-Methode

Dauer der Inf.	Probe	[Wochen]	[ODn]	[AI]	Dauer der Inf.	Probe	[Wochen]	[ODn]	[AI]
RI 20 W	RI 1	4	0,04	0,24	RP 20 W	RP 1	28	1,73	1,01
	RI 2	8	0,16	0,60		RP 2	31	1,33	0,86
	RI 3	9	0,05	0,43		RP 3	35	1,21	0,87
	RI 4	13	0,45	0,67		RP 4	48	2,71	0,94
	RI 5	13	0,70	0,71		RP 5	54	2,43	0,95
	RI 6	14	0,41	0,65		RP 6	54	2,07	0,94
	RI 7	17	0,09	0,52		RP 7	93	1,73	0,95
FP 20 W	FP 1	4	1,23	0,93	FI 20 W	FI 1	27	0,77	0,56
	FP 2	7	0,89	0,95		FI 2	29	0,45	0,77
	FP 3	8	1,05	0,86		FI 3	35	0,19	0,66
	FP 4	9	1,19	0,97		FI 4	43	0,27	0,51
	FP 5	12	2,55	0,86		FI 5	52	0,49	0,50
	FP 6	13	0,86	0,90		FI 6	61	0,11	0,60
	FP 7	16	0,81	0,95		FI 7	94	0,68	0,89 ¹

¹ = richtig-prävalent klassifiziert worden durch Aviditäts Methode;

RI (gelb) = richtig-inzident; FP (blau) = falsch-prävalent; RP (orange) = richtig-prävalent; FI (pink) = falsch-inzident

Bei der Auswahl der jeweiligen richtig-bestimmten Proben wurde darauf geachtet, dass eine ähnliche Infektionsdauer, nachdem die Proben gewonnen wurden, im Vergleich zu den falsch-bestimmten vorlag (Tab. 9).

Diese 28 Proben wurden in allen Methoden untersucht. Teilweise wurde die Hälfte (n = 74) oder das gesamte RPP (n = 148) untersucht. Für die Darstellung dieser Ergebnisse wurde dieselbe Einteilung und Farbcodierung wie für die 28 Proben (Tab. 9) übernommen.

3.2.1 Wirtsdeterminanten

Als Wirtsdeterminanten werden Faktoren bezeichnet, die durch das Individuum genetisch determiniert sind, wie zum Beispiel das Immunsystem. So ist beschrieben, dass der Titer an neutralisierenden Antikörpern (NT-AK), mit denen das Immunsystem in der Lage ist, HIV zu eliminieren, individuell verschieden hoch sein kann [158]. Auch der Gesamtgehalt an IgG-Antikörpern oder die IgG-Subklassen Verteilung sind individuellen Schwankungen unterworfen. Da alle etablierten Inzidenz-ELISA aufgrund der Antikörperantwort zwischen inzident und prävalent unterschieden, wurden der IgG-Gehalt und NT-Titer in der Hälfte der Proben des RPP bestimmt (n = 74).

3.2.1.1 Höhe der neutralisierenden Antikörpertiter

Es könnte sein, dass Patienten mit einem besonders hohen Titer an NT-AK besonders schnell und effizient HIV eliminieren können, so dass vergleichsweise nur ein insgesamt niedriger Antikörper-Spiegel erreicht wird, bzw. die Avidität der Antikörper nur langsam reift, da weniger Antigen vorhanden ist.

Eine andere Theorie wäre, dass Patienten mit einem besonders hohen Titer an NT-AK auch eine allgemein bessere Antikörper-Antwort gegen HIV aufweisen und so im frühen Verlauf der Infektion einen höheren Titer an IgG-Antikörpern oder Antikörper mit einer höheren Avidität bilden.

Um mögliche Zusammenhänge aufzudecken, wurde der Titer an NT-AK gemessen. Es ergaben sich keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Titer an NT-AK und der Klassifizierung von inzidenten und prävalenten Proben (Abb. 13).

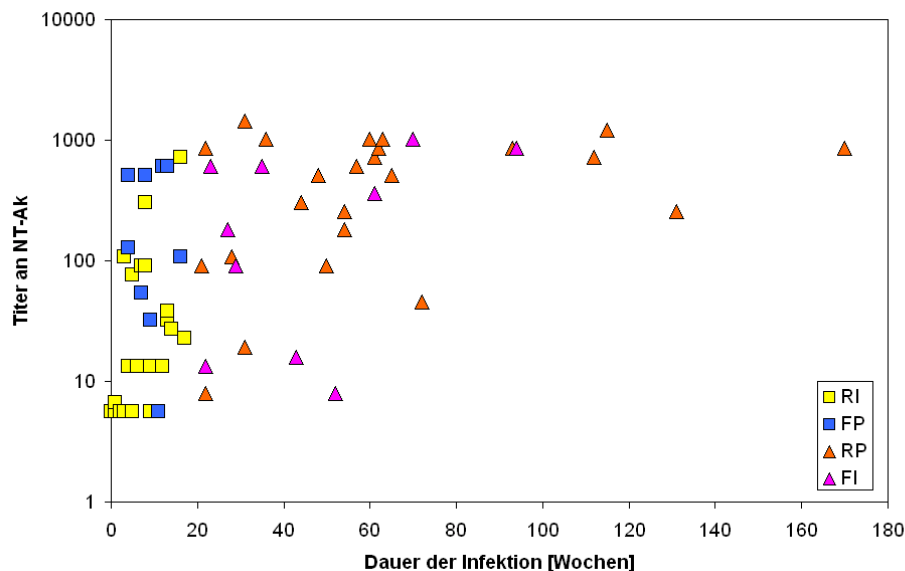


Abb. 13: Untersuchungen zur Abhängigkeit des neutralisierenden Antikörpertiters von der Infektionsdauer

Gemessen wurden 74 Proben des Referenzprobenpanels; Vierecke ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion, RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent; Dreiecke > 20 Wochen Dauer der Infektion, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9). Dargestellt für den Titer an NT-Ak ist der reziproke Wert der Verdünnung, bei der ein 50%tige Neutralisation auftrat.

Obwohl der NT-Titer im Verlauf der Infektion anstieg, zeigte sich weder ein Zusammenhang zwischen dem Ergebnis des BED-ELISA und dem Titer an NT-AK und auch nicht zwischen den Ergebnissen des AI und dem Titer an NT-AK (siehe Abb. 14).

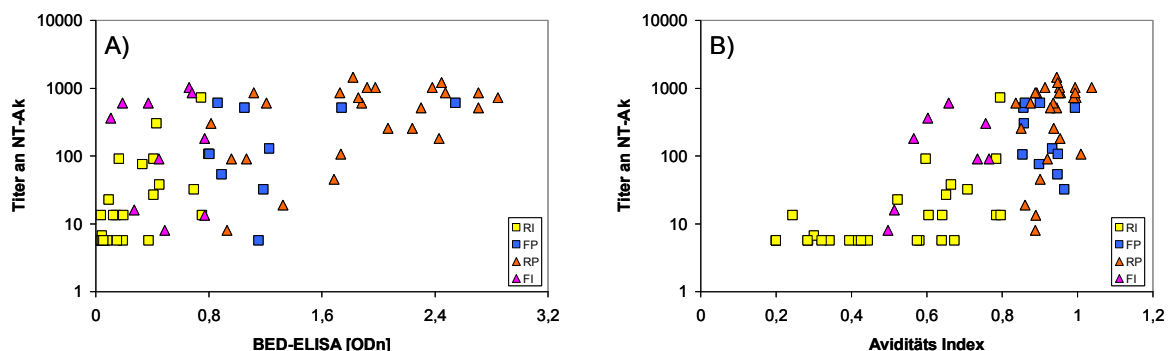


Abb. 14: Abhängigkeit des neutralisierenden Antikörpertiters von der ODn des BED-ELISA und dem Aviditäts-Index

Gemessen wurden 74 Proben des Referenzpanels im BED-ELISA (a) und Aviditäts-Index (b); Vierecke ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion, RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent; Dreiecke > 20 Wochen Dauer der Infektion, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9). Dargestellt für den Titer an NT-Ak ist der reziproke Wert der Verdünnung der Proben, bei der eine 50%tige Neutralisation auftrat.

3.2.1.2 Untersuchungen des IgG-Gehaltes

Im BED-ELISA werden spezifische Anti-HIV-1 gp41 IgG-Antikörper in Normierung auf den Gesamt-IgG-Gehalt bestimmt. Es ist in der Literatur beschrieben, dass bei einer HIV-Infektion eine Hypergammaglobulinämie auftreten kann [159].

Dies könnte zu falschen Ergebnissen in der Standard HIV-Serologie als auch im BED-ELISA führen. Daher wurde in 74 Proben des RPP der IgG-Gehalt bestimmt, um zu überprüfen, ob bei den durch den BED-ELISA falsch klassifizierten Proben Auffälligkeiten im IgG-Gehalt zu beobachten waren. Insgesamt lagen die gemessenen Werte für den IgG-Gehalt zwischen 892mg/dl und 2653mg/dl (MW 1414mg/dl; STABW 357mg/dl). Der Normalwert für Erwachsene liegt zwischen 700 und 1600mg/dl [160]. Der erhöhte IgG-Gehalt ist erklärbar, da es sich um unbehandelte HIV-infizierte Patienten handelte, bei denen ein erhöhter IgG-Gehalt aufgrund des chronisch aktivierten Immunsystems beschrieben ist [60]. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem IgG-Gehalt und der Dauer der Infektion (Abb. 15), dem Ergebnis der BED Messung oder der Höhe des AI ermittelt werden (Abb. 16).

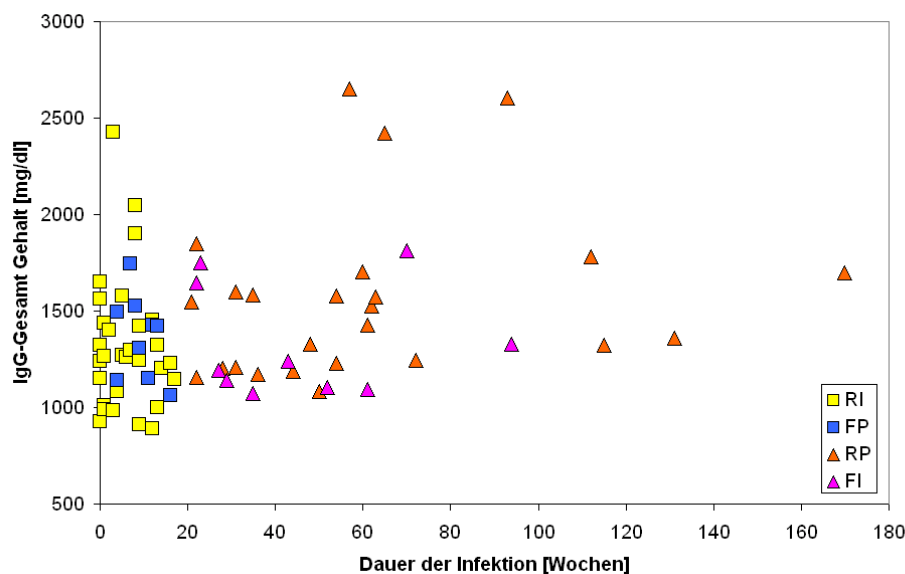


Abb. 15: Untersuchungen zur Abhängigkeit des IgG-Gehalt von der Infektionsdauer

Gemessen wurden 74 Proben des Referenzprobenpanels; Vierecke ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion, RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent; Dreiecke > 20 Wochen Dauer der Infektion, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

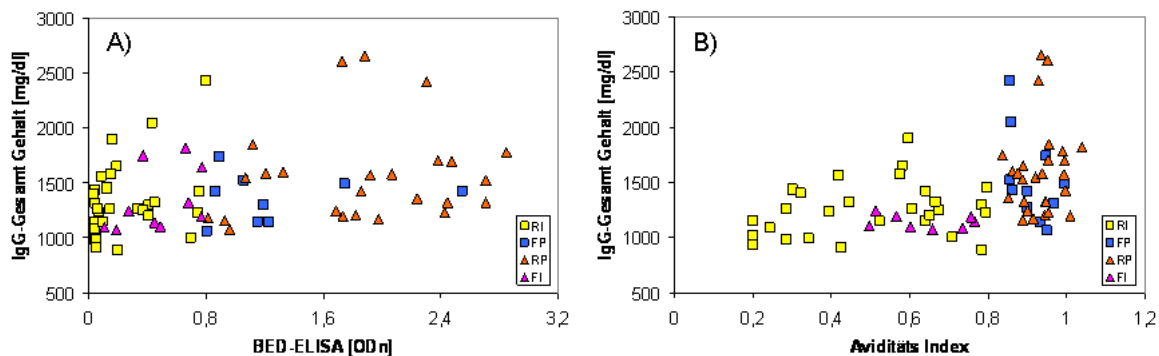


Abb. 16: Untersuchungen zur Abhängigkeit des IgG-Gehalt von der ODN des BED-ELISA und von dem Aviditäts-Index

Gemessen wurden 74 Proben des Referenzpanels im BED-ELISA (a) und Aviditäts-Index (b); Vierecke ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion, RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent; Dreiecke > 20 Wochen Dauer der Infektion, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

Es ergab sich keinerlei Hinweis, dass der IgG-Gehalt ein Parameter ist, aufgrund dessen eine bessere Diagnostik inzidenter Infektionen erfolgen könnte oder der die unterschiedliche Antikörperantwort der falsch klassifizierten Proben erklären könnte.

3.2.1.3 Untersuchungen der IgG-Subklassen

Wenn man den IgG-Gehalt untersucht, erfasst man die IgG-Antikörper aller vier Subklassen (IgG1 bis IgG4). Es ist beschrieben, dass es im Verlauf einer viralen Infektion zu einem IgG-Subklassen Wechsel von IgG1 zu IgG3 innerhalb der ersten vier bis zwölf Wochen der Infektion kommt [161]. Daher könnte der Gehalt an IgG-Subklassen einen guten Marker für eine verbesserte Erkennung inzidenter Infektionen darstellen. Es wurde der Gehalt aller vier IgG-Subklassen in dem Referenzset von 28 Proben gemessen.

Alle Werte lagen innerhalb der Normwerte für Erwachsene, wenn auch die Mittelwerte der 28 Proben für IgG1 mit 9,3g/l (Normbereich für IgG1 bei Erwachsenen 4,9 bis 11,4g/l) und für IgG3 mit 1,1g/l (Normbereich für IgG3 0,2 bis 1,1g/l) im oberen Bereich lagen [162]. Es ergab sich für die Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4 keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Kategorien RI, FP, RP und FI (siehe Abb. 17, für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9). Es fiel auf, dass richtig-inzident bestimmte Proben einen deutlich niedrigeren IgG1 Gehalt hatten, als die richtig-prävalenten, während die richtig-inzident bestimmten Proben im Gegensatz zu den richtig-prävalent bestimmten Proben einen höheren IgG2 Gehalt aufweisen. In beiden Subklassen ist der Mittelwert der falsch-prävalent bestimmten Proben immer dem Mittelwert der richtig-inzident bestimmten Proben ähnlich.

Betrachtet man die Ergebnisse für den IgG3-Gehalt bei den wahr-prävalenten Proben (Abb. 17 und Abb. 18), so ist hier ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert der sieben richtig-prävalent gemessenen ($1,61\text{g/l} \pm 0,61\text{g/l}$) und dem Mittelwert der sieben falsch-inzident ($0,78\text{g/l} \pm 0,32\text{g/l}$) gemessenen Proben zu sehen ($p = 0,0078$). Das heißt, die falsch-inzident gemessenen Proben zeichnen sich durch einen atypisch niedrigen IgG3-Spiegel aus.

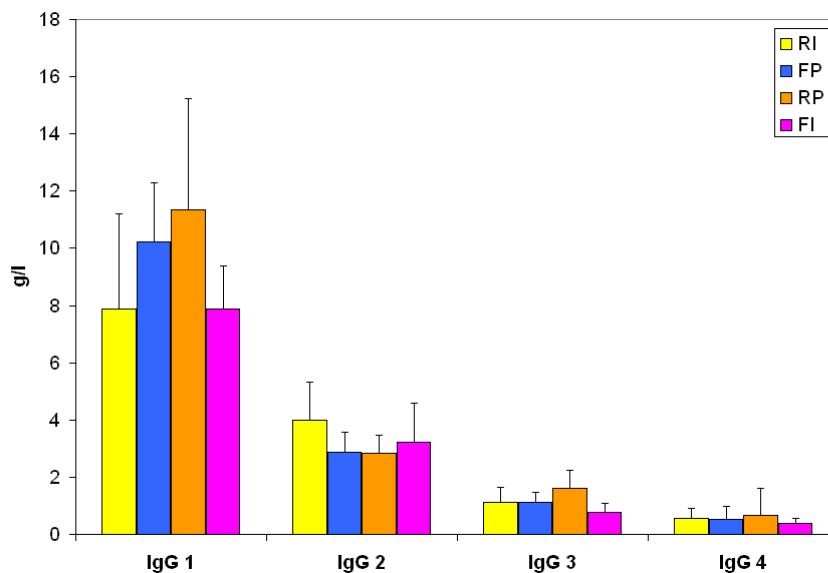


Abb. 17: IgG-Subklassen Verteilung

28 Proben des RPP, die Balken stellen die MW und STABW von sieben Proben in der jeweiligen Kategorie dar. RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

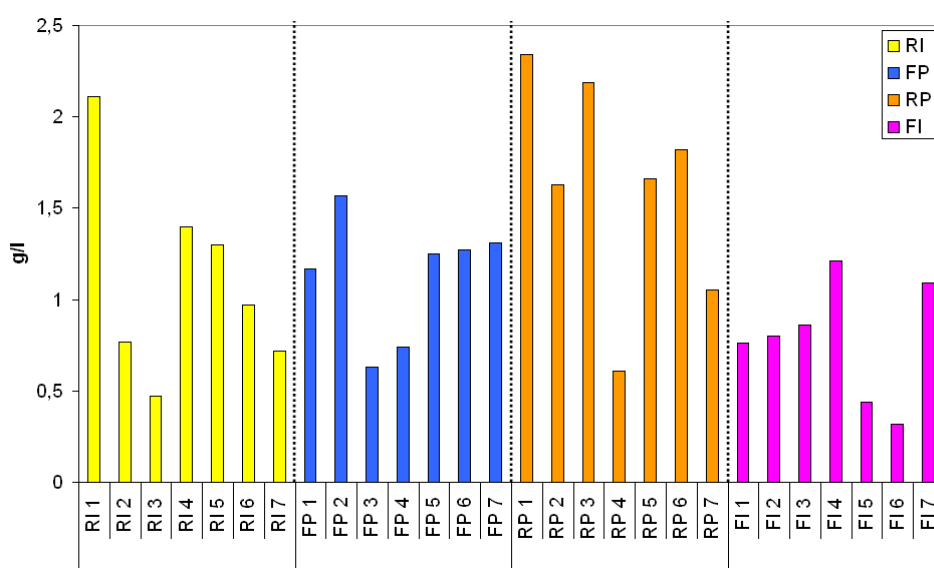


Abb. 18: Einzelbestimmung des IgG3-Gehaltes des 28 Probenpanels

RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

Auch nach Bestimmung des IgG3-Gehaltes in allen 148 Proben des RPP blieb der signifikante Unterschied zwischen den prävalent gemessenen und den falsch-inzidenten bestimmten Proben bestehen, wenn auch weniger ausgeprägt ($p = 0,019$, Abb. 19). Es konnte also ein Unterschied in der Verteilung der IgG-Subklassen für die IgG3 Antikörper festgestellt werden: die 71 im BED-ELISA richtig-prävalent bestimmten Proben des RPP hatten statistisch signifikant einen höheren IgG3-Gehalt als die 12 durch den BED-ELISA falsch-inzident bestimmten Proben, obwohl diese nach über 20 Wochen Infektionsdauer entnommen worden waren.

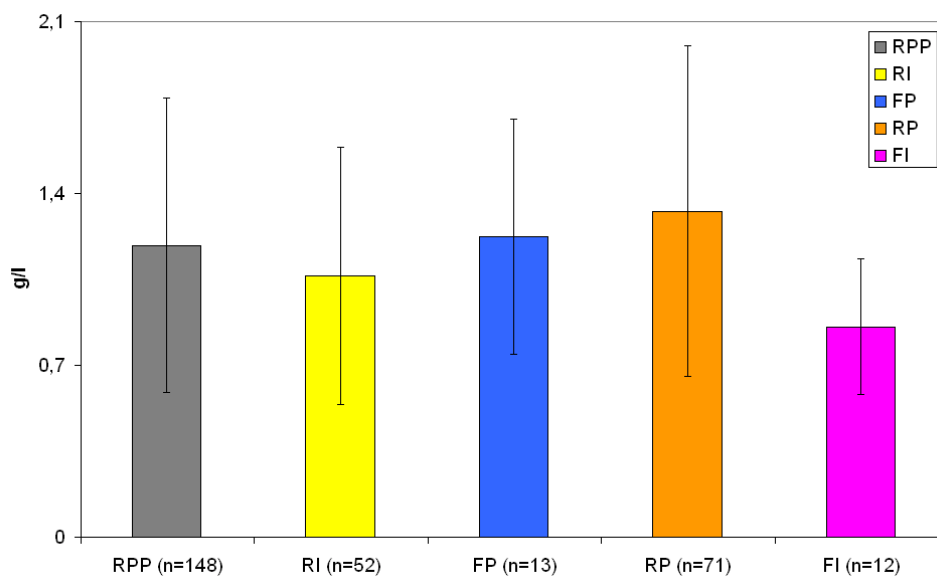


Abb. 19: IgG3-Gehalt der Proben des RPP und BED-ELISA Reaktivität

Die Einteilung in die vier Gruppen erfolgte nach den BED-ELISA Resultaten. Die Balken stellen den MW und STABW der jeweiligen Kategorie dar. RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

3.2.1.4 Reaktivität der HIV-spezifischen Antikörper im Western Blot in Gegenwart von Gu-HCl

Um der Frage nachzugehen, ob es weitere virale Antigene gibt, gegen die sich die Antikörperantwort im Verlauf der frühen HIV-Infektion so ändert, dass sie zur Inzidenz-Testung eingesetzt werden könnten, wurde die Reaktivität der 28 Proben im Western Blot (WB) untersucht.

Für andere Infektionen wurde mehrfach gezeigt, dass ein chaotropes Agens auch im WB einen destabilisierenden Einfluss auf die Bindung wenig avider Antikörper hat und man sich dies zur Erkennung frischer Infektionen zu Nutze machen kann [122-124, 126, 163]. Deshalb wurden die Signalstärken im WB (HIV Blot 2.2) untersucht und ein AI daraus ermittelt.

Jede Probe wurde in einer 1:10 Verdünnung in PBS und in einer 1:10 Verdünnung mit Gu-HCl (ein molar) untersucht. Aus den Bandenintensitäten auf beiden Streifen wurde der WB-AI berechnet (2.3.8).

Alle Proben hatten Antikörper gegen die Hüllproteine gp160/gp120. Ansonsten konnten von insgesamt 26 Proben Antikörper gegen p24 nachgewiesen werden, während Antikörper gegen p55 oder gegen p39 nur in zwei bzw. eine Probe nachzuweisen waren.

Tab. 10: Antikörperreaktivität gegen verschiedene Antigene des 28er Probenpanels im WB

	gp160/120	p66	p55	p51	gp41	p39	p31	p24	P17
RI ¹ (n = 7)	7	4	1	2	3	1	2	7	4
FP ² (n = 7)	7	6	-	4	4	-	6	7	4
RP ³ (n = 7)	7	5	1	4	4	-	6	7	2
FI ⁴ (n = 7)	7	5	-	5	4	-	7	5	4

¹ RI = richtig-inzident, ² FP = falsch-prävalent, ³ RP = richtig-prävalent, ⁴ FI = falsch-prävalent

Eine p51 Bande und p31 Bande zeigten unter den sieben im BED-ELISA richtig-inzident bestimmten Proben (RI) nur eine bzw. zwei Proben, während bei den anderen drei Gruppen (FP; RP; FI) vier bis sieben Proben Antikörper gegen diese Proteine nachweisbar waren. 20/28 Proben wiesen Antikörper gegen p66 auf, 15/28 gegen gp41 und 14/28 gegen p17 Banden (Tab. 10). Für gp160/120 und p24 ergaben sich in der WB-AI Auswertung keine signifikanten Unterschiede innerhalb der vier verschiedenen Gruppen, da die Standardabweichungen zu groß waren (Abb. 20). Es zeigte sich aber, dass für die Gruppe RI für gp160/120 der Einfluss des Gu-HCl am größten war. Dies zeigte sich vor allem in dem Mittelwert des WB-AI von knapp 0,5, während die anderen drei Gruppen FP, RP und FI einen WB-AI-Mittelwert über 0,8 aufwiesen.

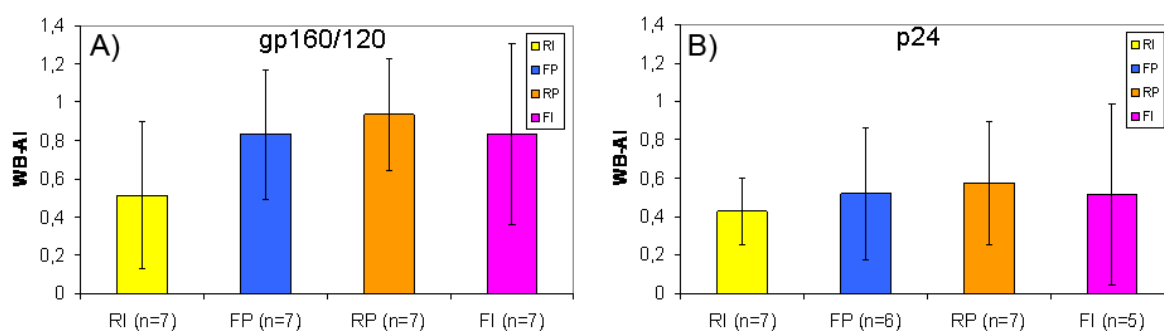


Abb. 20: Western-Blot Aviditäts-Index des 28er Probenpanels

(A) gp160/120 (B) p24, jeweils MW und STABW dargestellt. Bestimmung des WB-AI siehe 2.3.8. RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

Der WB-AI konnte für p24 nur von 25 Proben berechnet werden, da eine FP-Probe in der Anwesenheit von Gu-HCl negativ wurde (Abb. 20). Alle Mittelwerte des WB-AI lagen für p24 sehr eng beieinander und es ließen sich keine Unterschiede zwischen richtig-inzidenten und richtig-prävalenten Proben feststellen.

3.2.1.5 Das HIV-1 gp41 im Peptid-ELISA

Sowohl im AxSYM HIV-1/2 gO als auch im BED-ELISA werden Antikörper gegen das HIV-Hüllprotein *env* gp-41 nachgewiesen. Im BED-ELISA werden ausschließlich spezifisch gegen die immundominante Region des HIV-1 gp41 gerichtete Antikörper zur Unterscheidung zwischen inzidenten und prävalenten Proben gemessen. Es wurde daher ein Peptid-ELISA mit 15 Aminosäure langen, überlappenden Peptiden des HIV-1 gp41 durchgeführt, um Antikörperreaktivitäten detektieren zu können, mit denen die unterschiedlichen Reaktionskategorien RI, FP, RP und FI im BED-ELISA korrelieren (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9). Getestet wurde wiederum das Referenzset der 28 Proben aus den vier Reaktionskategorien RI, FP, RP und FI. Es wurden zunächst Pools von fünf bzw. zehn Peptiden der 85 Peptide des gp41 gebildet (2.3.7, Tab. 1).

Der Pool 3 enthielt die immundominante Domäne, die auch das BED-ELISA-Antigen enthält. Im Pool fünf waren Peptide mit der Epitopen der neutralisierenden Antikörper 4F10 und 2F5.

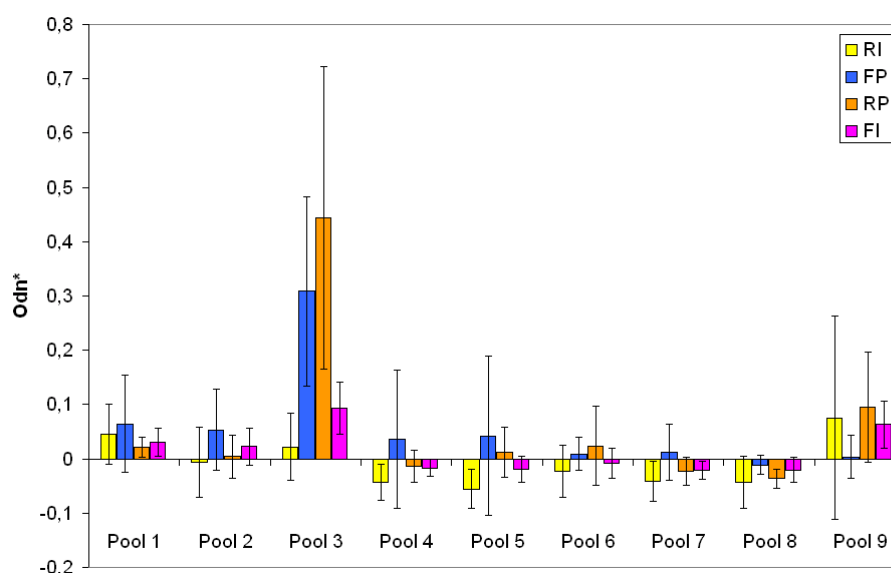


Abb. 21: Antikörperreaktivität gegen *env* gp41 Peptide

ODn* des 28 Probenpanels im Peptid-ELISA des HIV-1 gp41, jeweils MW und STABW von sieben Proben pro Gruppe dargestellt. Berechnung der ODn* siehe 2.3.7. RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

Die Transmembranregion war auf Peptiden des Pools fünf und sechs und ab Pool sechs sind Peptide des zytoplasmatischen bzw. intraviralen Bereichs von gp41 enthalten. Da Pool drei die immundominante Region enthält, deren AS-Sequenz dem Antigen des BED-ELISA entspricht, war zu erwarten, dass die Antikörperantworten gegen Pool drei den Ergebnissen im BED-ELISA entsprechen. Es wurde eine starke Antikörperantwort in den sieben prävalenten Proben (orange) und den sieben falsch-prävalenten Proben (blau) gemessen, die auch im BED-ELISA stark reagierten (Abb. 21).

Die Antikörperantwort gegen die anderen Peptid-Pools war nicht ausgeprägt mit einer mittleren ODn^* von $< 0,1$. Vor allem bei den im BED-ELISA richtig-inzident bestimmten Proben RI war die Antikörperreaktivität gegen die NKS-Kontrolle oft höher als gegen die einzelnen Peptid-Pools. Daraus resultierten die negativen ODn^* -Werte (Abb. 21). Eine erhöhte Antikörperreaktivität wurde gegen die Peptide der Pools eins und neun beobachtet. Es wurde aufgrund der geringen Reaktionsstärke überprüft, ob die Reaktivität gegen einzelne Peptide durch den Verdünnungseffekt beim Herstellen der Pools erniedrigt wurde. Dazu wurden diese drei Pools in die jeweils fünf (Pool eins) bzw. zehn (Pool drei; Pool neun) Einzelpeptide aufgetrennt und alle 28 Referenzproben gemessen. Die ODn^* -Werte der Antikörper gegen die Einzelpeptide aus Pool eins und neun waren so gering, dass sie keine Aussagen zuließen (Ergebnis nicht gezeigt).

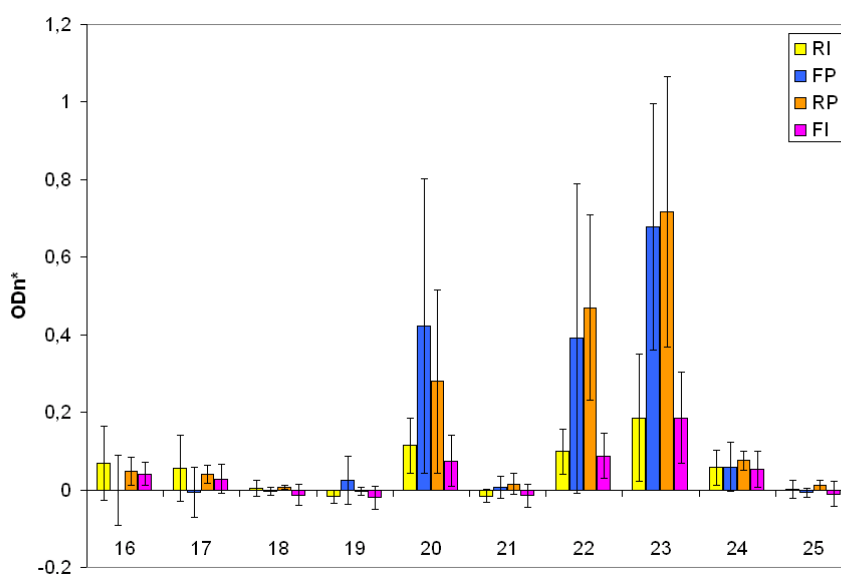


Abb. 22: Peptid-ELISA Reaktivität des Referenzsets gegen Pool 3 Peptide

ODn^* der vier Reaktionskategorien des 28 Probenpanels im Peptid-ELISA des HIV-1 gp41 gegen die Einzelpeptide des Pool drei; jeweils die MW und die STABW von sieben Proben pro Gruppe dargestellt.

RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (Tab. 9).

In diesen Bereichen des gp41 lag also keine stärkere Einzelreaktivität gegen ein einzelnes Peptid vor, die durch die Verdünnung im Pool reduziert worden wäre. Im Pool drei zeigte sich eine deutlich unterschiedlich starke Antwort der verschiedenen Gruppen auf die Einzelpeptide (Abb. 22). Nur die falsch-prävalent und richtig-prävalent bestimmten Proben wiesen Reaktivität gegen die Peptide 20, 22 und 23 auf. Für alle anderen Peptide blieb die Reaktivität der Proben $< 0,2 \text{ ODn}^*$ (Abb. 22; Tab. 11).

Tab. 11: Aminosäuresequenzen der 10 Einzelpeptide des Pool 3

Peptide Nr.	AS Sequenz des Peptides	Reaktivität im Peptid-ELISA
16	TVWGIKQLQARVLAV	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
17	IKQLQARVLAVERYL	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
18	QARVLAVERYLK DQQ	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
19	LAVERYLK DQQLLGI	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
20	RYLK DQQLLGIWGCS	FP und RP $> 0,2 \text{ ODn}^* =$ reaktiv
21	DQQLLGIWGCSGKLI	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
22	LGIWGCSGKLICTTT	FP und RP $> 0,2 \text{ ODn}^* =$ reaktiv
23	GCSGKLICTTT VTPWN	FP und RP $> 0,2 \text{ ODn}^* =$ reaktiv
24	KLICTTT VTPWNASWS	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv
25	TTT VTPWNASWSNKSL	$< 0,2 \text{ ODn}^* =$ nicht reaktiv

In rot markiert die AS-Sequenzen für das Peptid, welches als Antigen im BED-ELISA verwendet wird; FP = falsch-prävalent; RP = richtig-prävalent

3.2.2 Virale Determinanten

Möglicherweise gehen die variablen Antikörperantworten auf Unterschiede in den viralen Antigenen zurück. Das HIV-Hüllprotein ist hypervariabel und möglicherweise könnten Sequenzvarianten in der immundominanten Region im gp41 die falsch-inzidenten und falsch-prävalenten Reaktivitäten in den Inzidenz-Testen erklären.

Deshalb wurde die immundominante Region des gp41 von HIV des 28er Probenpanels durch eine Analyse der Aminosäure-Sequenzen genotypisch untersucht. Hierzu wurde eine Populationssequenz des *env* gp41 aus 28 Proben (AS 565 bis 677) aus RT-PCR-Amplifikaten ermittelt.

Die Sequenzen zeigten eine für HIV *env* beschriebene Divergenz von 12-17% [164, 165] (Abb. 23). In dem Sequenzvergleich der Viren aus Patienten aller vier Reaktionskategorien wurde keine Häufung bestimmter Sequenzvarianten in einer der vier Reaktionsgruppen beobachtet.

Abb. 23, Sequenzalignment der 28 Populationssequenzen des HIV-1 *env* gp-41

Dargestellt sind die AS von aa565 bis aa677 des HIV-1 *env*. Als Referenzsequenz wurde die NL4-3-Sequenz (Acc.Nr. AF324493_pNL4-3) verwendet. Die Position des im BED-ELISA als Antigen verwendeten Peptids in der immundominanten Domäne und das Epitop für die monoklonalen neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 sind eingezeichnet (Boxen).

RI (gelb) = richtig-inzident, FP (blau) = falsch-prävalent, RP (orange) = richtig-prävalent, FI (pink) = falsch-inzident (für die Einteilung der Kategorien siehe Tab. 9).

	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670														
NL43	TTRQQHLLQITWVEINQLQARILAVERYLK												PPNARSWSNK-SLEQX~KNNNTVMQNDREINNYTSLTHSLIEESQNDQEKNEDEELLELDKKWASLAWVEN												
	Immunodominante Domäne												Neutralisierende AB Domäne												
RI 1	V	R	T	T	T	T	S	RY	D	RQ	EG	D	N	YT	L	Y	A	M	N	T	X				
RI 2	V	Q	V	I	R	T	T	DY	G	Q	EK	D	DT	YK	Q		A	D		D					
RI 3	X	XL	R	X	T	S	ST	N	SD	D	Q	E	D	EI	Y	L	Q		G	S					
RI 4	V	L	R	T	T	T	NKTIDD	A	Q	EK	D	GI	YT	I						D					
RI 5	M		N	D	D	D	NKST	DM	Q	EK	D	DQ	YY	LT	DR		A		S	D					
RI 6	M		N	N	N	N	DK		Q	E	S	S	YN	T	M		A			D					
EP 1	V		V				QGE	Q	D	KK	Y									D					
EP 2	V	Q	V	T	T	T	K	EK	D	G	YT						Q			S					
EP 3	M		V	T	X	X	EDX	K	Q	EK	D	XV	YN	L	X		A	N	S	X					
EP 4	V		V				DK		E	D	Y								X						
EP 5	V	R	S	S	S	T	T	XK	X	Q	ET	S	XI	YT	L				N						
EP 6	V	X	V	X	X	X	HDE		Q	EK	D	G	YN	Q					S	D					
EP 7	HQ			X			M		Q	EK	D	Y								D					
RP 1	M		V				T	N	Y	D	X	Q	EK	D	QE	YN	I			D					
RP 2	V		V					QND				Q	EK	D	YT	L	L		N	X					
RP 3	V		V					XND		D		Q	EK	D	X	YT	L	L		N	S	D			
RP 4	V		V				T		DM			E	D	NI	YT	Q	T		A		T	D			
RP 5	M	R	V	X	X	X	D		XXD	X	Q	K		E	YT	L	QA				D				
RP 6	M		V	T	T	T			N			K	YT				A	Q		D					
RP 7	M		V				T	N	Y	D	X	Q	EK	D	QE	YN	I			D					
FI 1	M		V	L	Q	S	T		TYN		D	Q	NK	D	YT			A	N	D	D				
FI 2	Q	K	V	L	T	T	S		QOE		E	LQ	K	S	DT	YR		D	A	N	D	D			
FI 3	M		V	L	Q	S	T		TYN		D	Q	XK	D	YT		X		A	N	D	D			
FI 4	M		V		X	X	T	N	Y	D		Q	EK	D	QE	YN	I			D	D				
FI 5		V	I	R	T	T	T		DY		G	Q	EK	D	DT	YK	Q			D	D				
FI 6	M		V	L	R		T		Q		K	Q	E	E	G	YN	L		A	D	S	D			
FI 7	V		V		P	I	I	KNKT	REL	GI	D		E	D	GI	YN	A				D				
																					2F5; 4E10				

Immunodominante Domäne

Neutralisierende AB Domäne

BED-Peptid

3.3 Ergebnisse der Berliner HIV-Inzidenz-Pilotstudie

Das Ziel der Berliner HIV-Inzidenz-Pilotstudie war die Evaluierung serologischer Methoden zur HIV-Inzidenz-Bestimmung. In der Pilotstudie sollten Daten zur Inzidenz von HIV-1 Infektionen in Berlin gewonnen werden. Gleichzeitig wurden Daten zu Wissen, Einstellung, Verhalten und Praktiken (KABP-Daten; „knowledge, attitudes, behaviour and practices“) bezüglich HIV/AIDS bei Personen mit kürzlich erworbener HIV-Infektion erhoben. Erhebungsinstrument war ein strukturierter Fragebogen mit überwiegend geschlossenen Fragen zum Themenkomplex. Anhand der erhobenen Daten soll erreicht werden, dass Präventionsmaßnahmen in HIV-Bereich zukünftig zielgerichteter und zielgruppenorientierter eingesetzt werden können.

3.3.1 Studienpopulation der Pilotstudie

Als Übertragungsweg der HIV-Infektion in der Studienpopulation überwog der homo- bzw. bisexuelle Kontakt: 119 Personen waren MSM (Abb. 24), sieben Personen gaben eine heterosexuelle Übertragung an und zwei Personen stammten aus HPL.

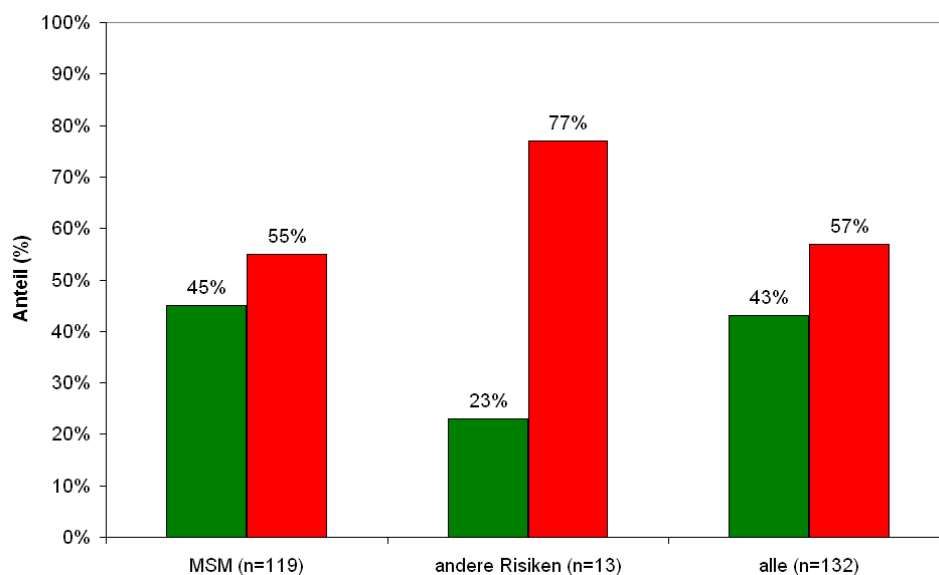


Abb. 24: Prävalenz und Inzidenz von Infektionen in Abhängigkeit vom Infektionsrisiko

Die grünen Balken zeigen den Anteil der inzident ermittelten Proben und die roten Balken die prävalent bestimmten Proben.

98% der Infektionen erfolgten in Deutschland, 80% der Studienteilnehmer machten spezifische Angaben zum Infektionsweg, 35% war der vermutete übertragende Partner persönlich bekannt und 6% gaben an, sich bei einem bekannt HIV-positiven Sexualpartner infiziert zu haben.

Von den Probanden wurde eine Serumprobe erhalten und im BED-ELISA gemessen. In der Pilotstudie wurde der BED-ELISA eingesetzt, da er bei vergleichbarer Sensitivität und Spezifität preisgünstiger und einfacher durchführbar als der AxSYM-ELISA war.

3.3.2 Epidemiologische Untersuchungen

Im Untersuchungszeitraum der Pilotstudie in Berlin vom November 2005 bis zum Februar 2008 wurden insgesamt 132 Patienten rekrutiert. Dies entsprach 26% der in Berlin im gleichen Zeitraum gemeldeten Zahl der HIV-Erstdiagnosen. 119 dieser Probanden waren MSM (90%). Diese Risikogruppe war im Studienkollektiv überrepräsentiert, da in Berlin im gleichen Zeitraum nur für 70% der gemeldeten HIV-Erstdiagnosen als Risikokategorie für die HIV-Infektion MSM gemeldet wurden. Signifikant niedriger als anhand der Meldedaten erwartet war der Anteil rekrutierter Frauen ($n = 7$; $p = 0,015$), Männer mit heterosexuellem Übertragungsrisiko ($n = 7$; $p = 0,037$) und Menschen aus HIV-Hochprävalenzländern entsprechend der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (HPL; $n = 2$; $p = 0,015$).

Für diese Studie wurde eine Adjustierung der BED-Messergebnisse unter Berücksichtigung der prädiktiven Werte des Testes (ermittelt anhand des Referenzprobenpanels) durchgeführt (2.3.6). Grundlage dieser Adjustierung ist die Annahme, dass sich Sensitivität und Spezifität des BED-ELISA im Studienkollektiv im BED-ELISA ähnlich wie im untersuchten Referenzprobenpanel verhalten.

Die adjustierten Anteile der frischen HIV-Infektionen lagen bei 51% für die gesamte Untersuchungspopulation und ergaben einen signifikanten höheren Anteil an inzidenten Infektionen unter MSM (54%; KI[95%]: 64; 45) im Vergleich zu Studienteilnehmern mit anderen Übertragungsrisiken (16%; KI[95%]: 36; 0). Aufgrund der geringen Zahl von Personen mit anderen Übertragungsrisiken als MSM wurde die weitere Analyse auf Daten der MSM Patienten beschränkt. Der Vergleich der Stichprobe der Pilotstudie mit den Daten der HIV-Fallmeldungen ergab für Berlin im Untersuchungszeitraum eine signifikante Übereinstimmung bezüglich Altersmedian und der Altersgruppenverteilung, so dass von einer Repräsentativität der Stichprobe für MSM in Berlin ausgegangen werden konnte.

FrISCHE HIV-Infektionen überwogen bei MSM in Berlin signifikant ($p = 0,009$) in jüngeren Altersgruppen (62% bei den 20 – 29-jährigen im Vergleich zu 17% bei den über 44-jährigen, Abb. 25).

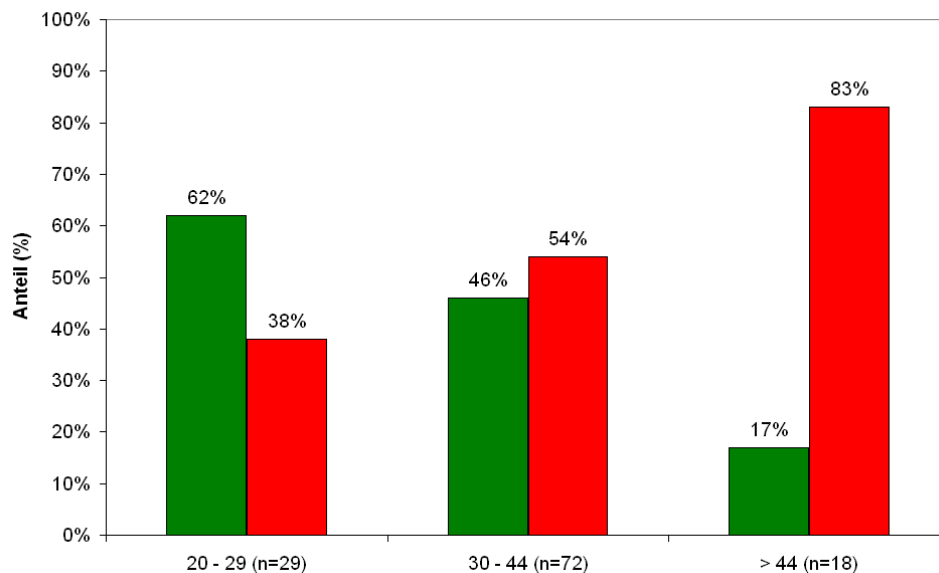


Abb. 25: Prävalenz- und Inzidenz von HIV-Infektionen nach Altersgruppen

Die grünen Balken bedeuten inzident im BED-ELISA gemessen und die roten Balken prävalent im BED-ELISA gemessen (Ergebnisse nur für die 119 MSM dargestellt).

Über 50% gaben an, bereits mindestens einen negativen HIV-Test vor der jetzigen Diagnose durchgeführt zu haben. 13% hatten vorher zwei bis vier und 7% über vier Tests. 18% hatten sich noch nie testen lassen. Der Zusammenhang zwischen der Anzahl früher durchgeführter HIV-Tests und der Erkennung einer frischen HIV-Infektion war statistisch signifikant ($p = 0,023$).

Für 37% ($n = 49$) der Fälle war eine akute HIV-Symptomatik angegeben, die sich bei Überprüfung der angegebenen Symptome jedoch nur für 30% ($n = 40$) klinisch als solche bestätigen ließ. Der Mittelwert der Tage seit dem letzten negativen Test bis zum Datum der Diagnosestellung lag bei 980 Tagen (2,7 Jahre), vom selbst eingeschätzten Beginn des Infektionsrisikos an bei 559 Tagen (1,5 Jahre) und vom Zeitpunkt des Auftretens einer akuten HIV-Symptomatik bei ca. drei Monaten.

Tatsächlich war der Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer frischen (inzidenten) Infektion und der Selbsteinschätzung des vermuteten Infektionszeitpunkts innerhalb des Zeitfensters von 140 Tagen im BED-ELISA signifikant (Abb. 26; $p < 0,001$). Dieses Ergebnis war vor allem von Interesse unter Berücksichtigung der Tatsache, dass lediglich 30% der Infizierten eine akute HIV-Symptomatik entwickelten.

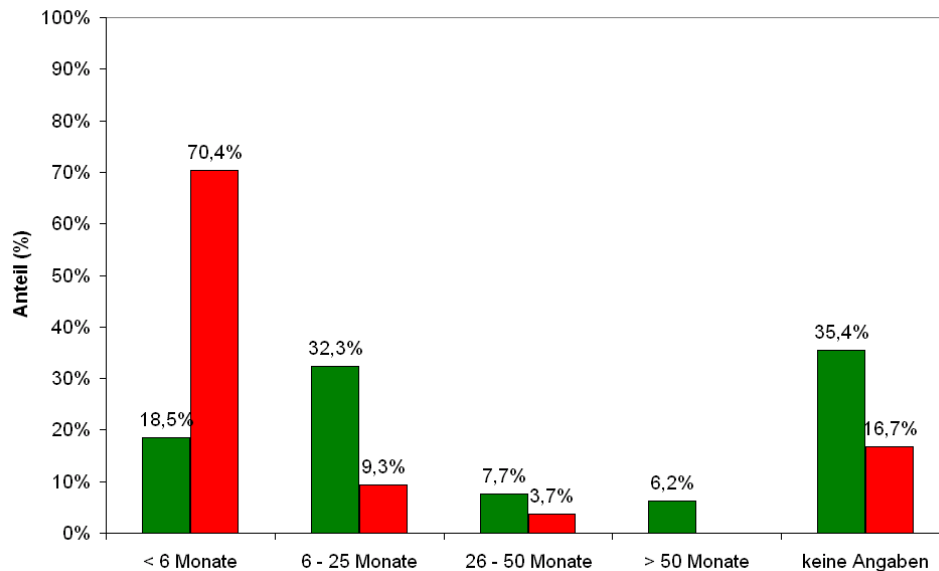


Abb. 26: Anteil frischer und länger bestehender HIV-Infektionen in Abhängigkeit vom selbst eingeschätzten Zeitraum für das Infektionsrisiko

Die grünen Balken bedeuten inzident im BED-ELISA gemessen und die roten Balken prävalent im BED-ELISA gemessen (nur für MSM dargestellt).

Patienten mit frischer HIV-Infektion hatten signifikant höhere Viruslasten im Vergleich zu Patienten mit prävalenter Infektion ($p = 0,005$), während sich für die $CD4^+$ -Zellzahlen kein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Viruslast zum Zeitpunkt der frühen Infektion wird als ein wesentlicher Faktor für eine höhere Übertragbarkeit in dieser Infektionsphase angesehen und hat damit auch aus epidemiologischer und Public Health Sicht eine besondere Bedeutung [166].

3.4 Untersuchungen zu Filter-getrockneten Proben

In der Berliner Pilotstudie wurde von allen Probanden EDTA-Blut erhalten und innerhalb von 24 Stunden transportiert und aufgearbeitet, das Plasma aliquotiert, bei -70°C gelagert und später im BED-ELISA eingesetzt. Für eine deutschlandweite Inzidenzstudie ist eine Versendung von mehreren tausend Proben als EDTA-Blut und ihre Aufarbeitung innerhalb von 24 Stunden an das RKI logistisch aufwendig und teuer. Daher war es untersuchenswert, die Methoden auch für Filter-getrocknete Materialien zu etablieren, die im Versand geringere Kosten verursachen und leichter handhabbar sind als EDTA-Blutproben.

3.4.1 Infektiosität von auf Filter getropften HIV

Um die Filter mit der Post verschicken zu können, sollte untersucht werden, ob HIV nach dem Trocknen auf Filterpapier noch infektiös ist. Für die Bestimmung der Infektiosität wurden serielle Verdünnungsreihen eines Virusstocks des molekularen Klon NL4-3 verwendet. Der Virusstock hatte einen Titer von $9,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml.

Für die in vitro-Versuche zur Inaktivierung von HIV in Filter-getrocknetem Material musste zunächst untersucht werden, ob Filtereluate ohne das Virus das Zellwachstum der CEMx174xSEAP-Zellen beeinflussen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass man die Filter nicht direkt in die Zellkultur einsetzen kann, da sie das Zellwachstum vollständig inhibieren. Das Filtereluat selbst wies ebenfalls eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum der Zellen auf (Abb. 27).

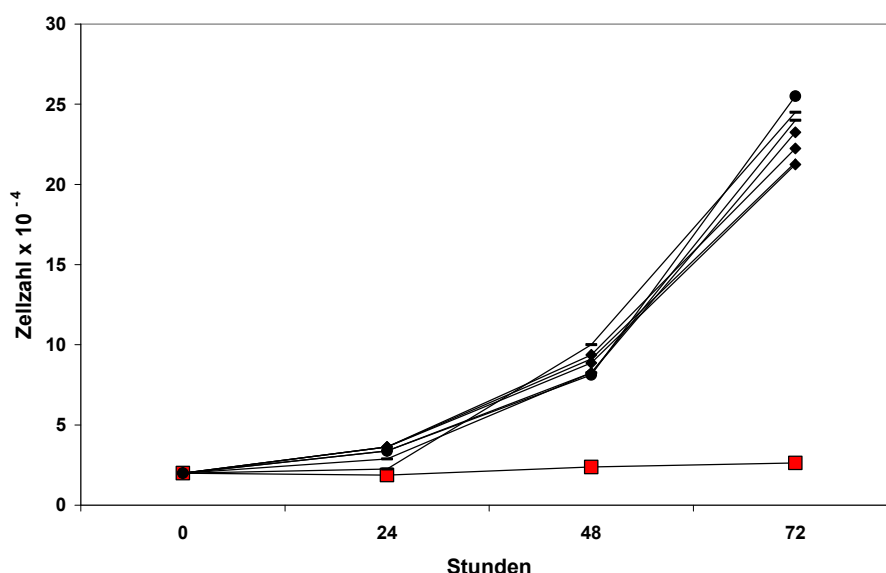


Abb. 27: Hemmung des Zellwachstum durch Filtereluat

Die roten Quadrate zeigen die Zellzahl in den Wells mit der 1:1 Verdünnung des Filtereluates, die restlichen schwarzen Zeichen zeigen die Zellzahlen in den Wells mit den Kontrollen oder den 1:3; 1:5 und 1:7 Verdünnungen des Filtereluat.

Der inhibitorische Effekt auf das Zellwachstum konnte durch eine 1:3 Verdünnung der Filtereluat mit Medium aufgehoben werden (Abb. 27), so dass für die weiteren Versuche 1:3 Verdünnungen eingesetzt wurden.

Für die Fragestellung nach der HIV-Inaktivierung auf Filter-getrockneten Proben wurden zwei Versuche durchgeführt. In dem ersten Versuch wurde das Inokulum nicht aus dem Ansatz entfernt. Alle Proben, bis auf die Negativ-Kontrollen, wiesen eine Konzentration von über 125pg/ml p24 auf, was auf das Inokulum zurückzuführen ist. Es wurde jedoch nur Viruswachstum in der Positiv-Kontrolle und beim 0h Wert identifiziert. Ab Abnahmetag 12 sanken die Messwerte, während die p24 Werte in den Positiv-Kontrollen und der 0h Wert konstant blieben (Daten hier nicht gezeigt).

Im zweiten Versuch zur Inaktivierung von HIV durch Filtertrocknung wurde das Virus-Inokulum nach der Infektion von den Zellen durch Waschen entfernt.

Zudem wurde ein zuvor im Labor etablierter p24-Antigentest (AALTO) eingesetzt. Dieser ist zwar weniger sensitiv als der Coulter-Assay, dafür ist der lineare Messbereich mit 75pg bis 10ng größer als für den Coulter-Assay (6,5pg bis 125pg) und für in vitro Experimente geeignet.

Alle Proben, bis auf die positiven Kontrollen und der 0h-Wert, waren auch bei dem zweiten geänderten Versuch nicht mehr infektiös. Zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten (Tag 4; 7; 10; 12 und 14) und in den passagierten Überständen wurde kein CPE beobachtet und kein p24-Antigen nachgewiesen. Die positiven Kontrollen sowie der 0h-Wert (20 Minuten nach dem Tropfen eluiert) zeigten schon nach Tag drei bis vier einen deutlichen CPE und hier waren alle Abnahmen mit einer Konzentration von > 10ng/ml im p24-Antigentest positiv. Auch wenn das Virus auf dem Filter nur für 12 Stunden getrocknet war, konnte keine Infektiosität von HIV mehr nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt).

3.4.2 Antikörpernachweis im HIV-ELISA und Western Blot aus Filter-getrocknetem Plasma

Zur Elution der Filter-getrockneten Proben ist eine Verdünnung des ursprünglichen Probenvolumens unvermeidlich. Der Trocknungsprozess könnte zudem die Stabilität der Antikörper oder der viralen RNA beeinträchtigen. Für Vergleichsuntersuchungen zwischen Plasma und Filter-getrockneten Proben in den serologischen HIV-Testen wurden aus der Serokonverter-Plasmabank des RKI 20 HIV-negative Plasmen, 30 ELISA- und WB-positive Plasmen und 30 ELISA-positive aber WB-fragliche Plasmen verwendet. Es wurden jeweils 30µl Plasma auf eine Filterscheibe getropft.

Dieses Volumen entspricht in etwa der Menge von einem Blutstropfen aus der Fingerkapillare.

Nach ein bis sieben Tagen Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Filter in 450µl Elutionspuffer eluiert (dies entspricht einer 1:15 Verdünnung der Ausgangsprobe) und anschließend in den beiden Screening-ELISA Murex HIV-1.2.O und Genscreen HIV 1/2 sowie im WB (HIV Blot 2.2) untersucht. Es kam lediglich in der Gruppe der fraglichen-reaktiven Proben zu Unterschieden (Tab. 12). Hier zeigten im WB 15 Filterproben keine Banden mehr. Durch die Probenverdünnung wurden 50% der fraglichen Proben falsch-negativ im WB getestet. ELISA-positive Proben zeigten keine falsch-negativen Ergebnisse nach der Elution (Tab. 12).

Da für den BED-ELISA nur im WB bestätigt-positive Proben getestet werden dürfen, stellt dies für eine Inzidenzstudie aus Filtermaterial keinen Nachteil dar.

Tab. 12: ELISA und WB-Reaktivität in Filtereluat

Antikörper-Reaktivität	Plasma			Filter		
	ELISA Murex	ELISA Genscreen	WB HIV Blot	ELISA Murex	ELISA Genscreen	WB HIV Blot
20 negative	20 neg	20 neg	20 neg	20 neg	20 neg	20 neg
30 positive	30 pos	30 pos	30 pos	30 pos	30 pos	30 pos
30 fragliche	30 pos	30 pos	30 fragl	1 fragl 15 neg 14 pos	1 neg 29 pos	15 fragl 15 neg

3.4.3 Inzidenz-Teste aus Filtermaterial

Nachdem gezeigt wurde, dass die Standard Serologie bei HIV-1 bestätigt-positiven Proben aus Filter-getrockneten Material kein Problem darstellt, sollte nun noch überprüft werden, ob auch der BED-ELISA aus filtergetropften Proben durchführbar ist, und ob sich die Sensitivität und Spezifität des Testes in Filterproben verändert. Hierzu wurden die 148 Proben des RPP, das BBI PRB 601 Panel auf Filter getropft (30µl je Filter) und die Filter bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Vergleiche der Messungen aus Plasma und aus den getropften Filterproben wurde Filter-getrockneter Kalibrator zum Normieren genutzt. Laut dem BED-ELISA-Handbuch sollte aus den Filterproben und dem „Dried Blood Spot Control Pack“ von Calypte für die Kontrollen und den Kalibrator ein 6mm großes Filterstückchen ausgestanzt werden und in 400µl Probenpuffer über Nacht eluiert werden [113]. 100µl des Eluates sollten für die Untersuchung direkt verwendet werden. Da am RKI vorgestanzte Filterkarten eingesetzt werden, wurden die Elutionsbedingungen an diese Filter angepasst.

Die Filter wurden in 450µl Elutionspuffer eluiert und dasselbe Volumen wie von einer Plasmaprobe in den jeweiligen Test eingesetzt.

Wenn der Kalibrator genauso behandelt wurde wie die Filterproben, wurde dieselbe Sensitivität und Spezifität wie mit den Plasmaproben erreicht (Abb. 28). Das RPP wurde zudem im IDE-V3-ELISA Test verglichen (F. Barin, Tours, Kooperation).

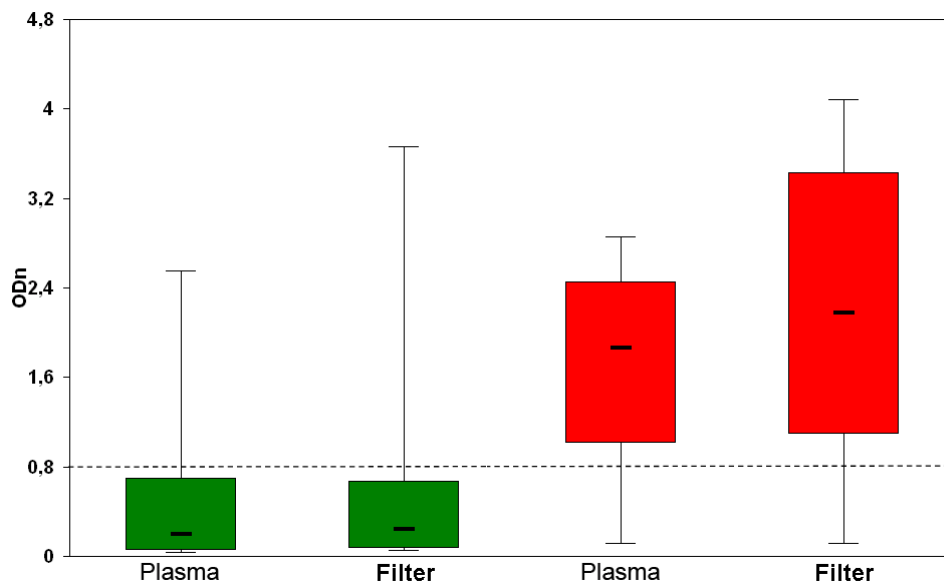


Abb. 28: Vergleich der Prävalenz- und Inzidenztestung von Plasma und Filter-getrockneten Plasma im BED-ELISA

Boxplots: Die Boxen zeigen die 25 bis 75% Quartile und der Balken in den Boxen den Median der inzidenten bzw. prävalenten Infektionen, die minimalen und maximalen Werte sind durch die Linien an den Boxen dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Cut-Off von 0,8 ODn. Grün ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion, rot > 20 Wochen Dauer der Infektion.

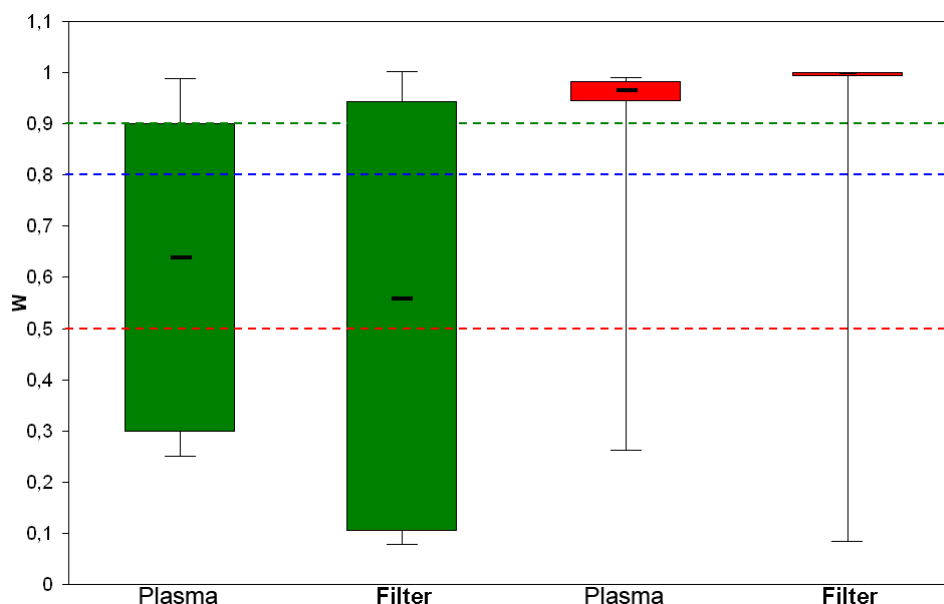


Abb. 29: Vergleich der Prävalenz- und Inzidenztestung von Plasma und Filter-getrockneten Plasma im IDE-V3-ELISA

Boxplots: Die Boxen zeigen die 25 bis 75% Quartile, der Balken in den Boxen den Median der inzidenten Infektionen ≤ 20 Wochen Dauer der Infektion (grün) und der prävalenten Infektionen > 20 Wochen Dauer der Infektion (rot), die minimalen und maximalen Werte sind durch die Linien an den Boxen dargestellt. Horizontale rote gestrichelte Linie: Cut-Off für inzident bei W = 0,5 wie von Barin *et al.* (2005) publiziert; Horizontale blaue gestrichelte Linie bei W = 0,8; Horizontale grüne gestrichelte Linie bei W = 0,9.

Erstaunlicherweise wurden mit dem IDE-V3-ELISA aus den Filterproben sechs Proben mehr richtig-inzident erkannt, als aus den Plasmaproben (Abb. 29).

Insgesamt wurden 33 Proben bei 24 Wochen Infektionsdauer und einem Cut-Off von $W = 0,5$ als inzident klassifiziert, nur eine davon falsch. Die Verdünnung im Filtereluat führte somit zu einer höheren Sensitivität bei gleicher Spezifität im Vergleich zu den Messdaten aus den Plasmaproben.

3.4.4 RNA Nachweis aus Filtermaterial

Für eine Reihe von Fragestellungen wäre es wünschenswert, wenn aus Filtergetrocknetem Material nicht nur die Antikörper, sondern auch die HIV-RNA quantifiziert und die *pol*-Sequenz zur Resistenzbestimmung ermittelt werden könnte. Aus Vorversuchen und Publikationen war bekannt, dass die Stabilität der viralen RNA möglicherweise ein Problem darstellt. Wichtig war daher, wie sensitiv sich RNA in getrocknetem Probenmaterial nachweisen lässt und welche Lagertemperaturen geeignet sind. In der Literatur gab es widersprüchliche Angaben, ob eine Lagerung der Filtergetrockneten Proben bei Raumtemperatur ausreicht [132] oder ob bei einer längeren Lagerung bei Raumtemperatur die RNA degradiert [167].

Die ersten vier Verdünnungsstufen des Konzentrationsstandards (2.2.3) wurden auf Filterscheiben getropft. Die Filter wurden 12 Stunden getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur, -20°C und -70°C gelagert.

Vor dem Einfrieren der Filter wurde als Null-Wert die RNA aus den Filterscheiben extrahiert. Die weiteren Extraktionszeitpunkte waren nach einer Woche, nach vier Wochen, nach drei Monaten und nach sechs Monaten.

Aus der extrahierten RNA wurde die cDNA synthetisiert (2.4.5) und die Inhaus-*pol* RT-PCR (2.4.6) durchgeführt sowie die Viruslast mit der quantitativen Real-time LTR-RT-PCR bestimmt (2.4.8).

Für die Amplifizierung des *pol*-Fragmentes zur Resistenzbestimmung sind nur die Daten der ersten drei Verdünnungsstufen gezeigt (Tab. 13). Die Nachweisgrenze lag bei dieser Methode bei 1×10^3 Genomkopien/ml Plasma. Die vierte Verdünnung lag mit rechnerisch maximal $3,4 \times 10^2$ eingesetzten Genomkopien demnach unter der Nachweisgrenze der Inhaus-*pol* RT-PCR. Virale RNA war in dieser Probe auch nicht mehr nachweisbar.

Die Amplifikation des *pol*-Fragmentes aus den Filterproben war auch nach 180 Tagen Lagerzeit noch möglich (Tab. 13). Allerdings zeigte sich vor allem bei niedrigen Kopienzahlen, dass die Amplifikation des *pol*-Fragmentes von den bei Raumtemperatur gelagerten Filtern schwieriger ist.

Nach sechs Monaten Lagerzeit war das *pol*-Fragment nur noch aus einem der beiden bei Raumtemperatur gelagerten Filter amplifizierbar (Tab. 13), so dass sich für die genotypische Resistenztestung aus Filterproben eine Lagerung der Proben bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ als geeignet erwies.

Tab. 13: Amplifikation des HIV-1-*pol*-Fragmentes aus Filter-getrockneten Plasmaproben bei verschiedener Lagertemperatur und Lagerdauer

Ausgangswert [gk/PCR]	Lagertemp	Null-Wert Vor dem Einfrieren	Lagerdauer (Doppelwerte pro Zeitpunkt)			
			7 Tage	4 Wochen	3 Monate	6 Monate
$3,4 \times 10^5$	RT	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Neg./Neg.
$3,4 \times 10^5$	-20°C	-	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.
$3,4 \times 10^5$	-70°C	-	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Neg./Neg.	Pos./Pos.
$3,4 \times 10^4$	RT	Pos./Pos.	Neg./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Neg./Neg.
$3,4 \times 10^4$	-20°C	-	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.
$3,4 \times 10^4$	-70°C	-	Neg./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.
$3,4 \times 10^3$	RT	Neg./Pos.	Neg./Neg.	Neg./Pos.	Pos./Pos.	Neg./Pos.
$3,4 \times 10^3$	-20°C	-	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.
$3,4 \times 10^3$	-70°C	-	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.	Pos./Pos.

[gk/PCR] = Genomkopien pro PCR-Ansatz; Pos. = Fragment amplifizierbar; Neg. = Kein Fragment amplifizierbar

Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von McNulty *et al.* (2005), die ebenfalls nur aus bei -20°C oder -70°C gelagerten Proben (Lagerzeit über fünf Jahre) eine Resistenztestung erfolgreich durchführen konnten, jedoch nicht aus den bei Raumtemperatur gelagerten Proben [167].

Die Viruslast war in allen 78 Filterproben messbar. Die Nachweisgrenze der Real-time LTR-RT-PCR zur Viruslastbestimmung aus frischem Plasma lag bei 1×10^2 Genomkopien/ml Plasma.

Nach sechs und teilweise schon nach drei Monaten Lagerung lag die Viruslast der bei Raumtemperatur gelagerten Filterproben um eine Zehnerpotenz niedriger als die der bei -20°C und -70°C gelagerten Filterproben (Abb. 30). Zum Beispiel wurde für die erste Verdünnungsstufe mit einem Ausgangswert von $3,4 \times 10^5$ nach 180 Tagen Lagerzeit von den bei Raumtemperatur gelagerten Filter eine Viruslast von im Mittel $2,4 \times 10^4$ ($\pm 3,8 \times 10^3$) gemessen, während für die bei -20°C und -70°C gelagerten Filter je $1,4 \times 10^5$ Genomkopien/PCR gemessen wurden ($\pm 4 \times 10^4$ und $\pm 1,7 \times 10^4$; Abb. 30).

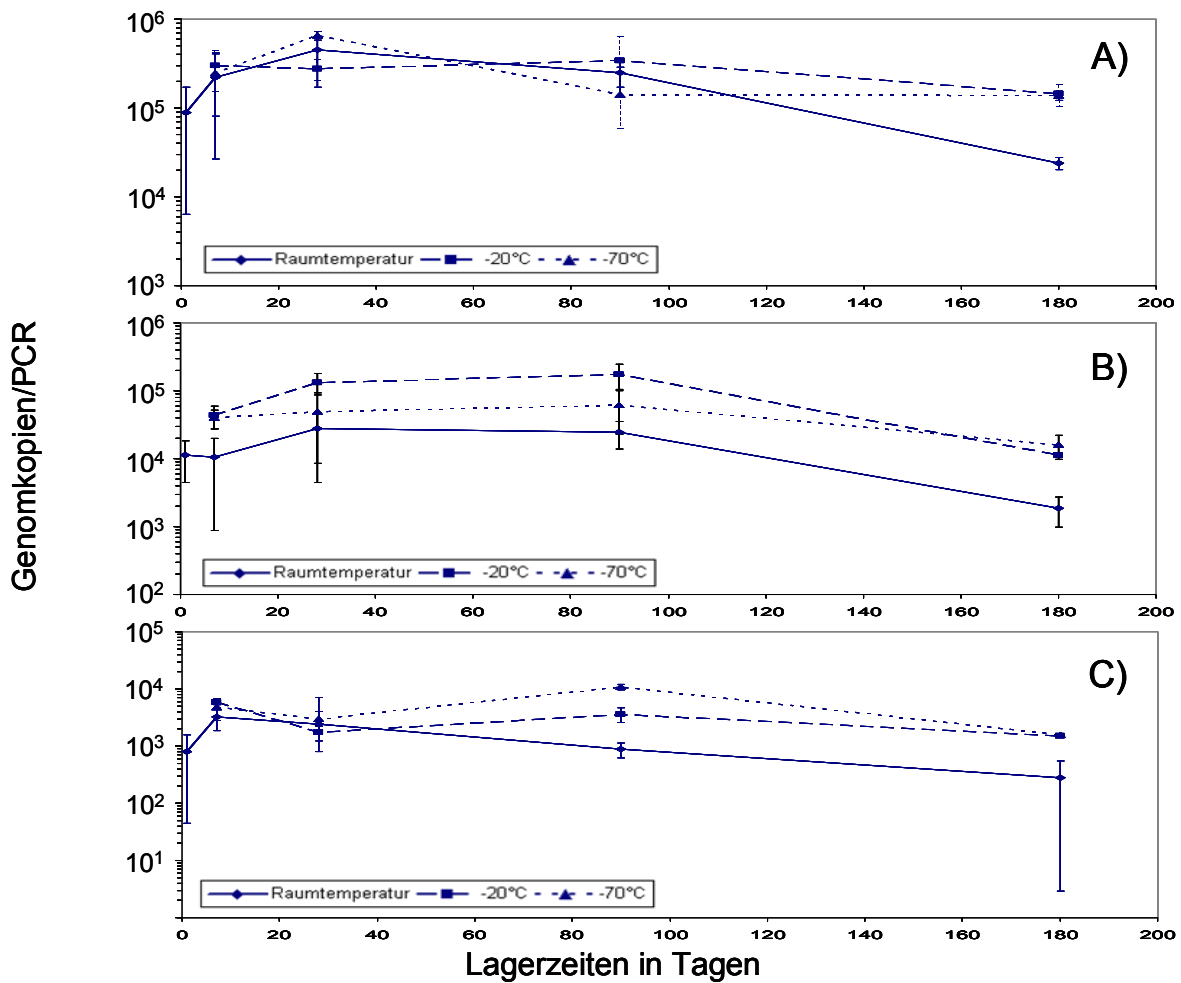


Abb. 30: Viruslast in Filter-getrockneten Proben bei verschiedenen Lagerzeiten und Lagertemperaturen

Gezeigt sind jeweils MW und STABW über 4 Messungen für jeweils die Ausgangswerte A) $3,4 \times 10^5$ Genomkopien/PCR; B) $3,4 \times 10^4$ Genomkopien/PCR, C) $3,4 \times 10^3$ Genomkopien/PCR.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Viruslastmessungen und genotypische Resistenzbestimmung aus Filter-getrocknetem Material möglich sind, auch wenn es aufgrund der getropften Ausgangsmenge (30 μ l Tropfvolumen) Limitierungen in der Anzahl nachweisbarer Genomkopien gibt. Sowohl für die Viruslast- als auch für die Resistenzbestimmung liegt die optimale Lagertemperatur der Filterproben bei $\leq -20^\circ\text{C}$.

4 Diskussion

Ein Ziel dieser Promotionsarbeit war die Etablierung einer Methode zur Unterscheidung zwischen inzidenten und prävalenten HIV-Infektionen anhand gut charakterisierter Proben (Referenzprobenpanel, RPP). Eine der etablierten Methoden (der BED-ELISA) wurde an einem Probenpanel in der Pilotstudie zur Untersuchung der HIV-Inzidenz in Berlin validiert. Mit der Pilotstudie sollte die Realisierbarkeit einer nationalen Inzidenzstudie geprüft werden.

Es wurden zwei Methoden, die verschiedene Parameter der HIV-spezifischen Antikörperantwort erfassen, etabliert. Mit der ersten Methode, dem BED-ELISA, wird das Verhältnis an HIV-spezifischen IgG-Antikörpern im Vergleich zu den gesamt IgG-Antikörpern gemessen. Mit der Aviditäts-Methode wird die Bindungsstärke der HIV-spezifischen Antikörper bestimmt. Beide Methoden sind dazu geeignet, frische HIV-Infektionen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu erkennen [111, 121]. Im Rahmen einer Kooperation mit Francis Barin wurde das RPP in einem dritten Inzidenz-ELISA, dem IDE-V3, getestet [114]. Dieser Test ist ein Peptid-ELISA, mit dem spezifische Antikörper gegen mehrere HIV-Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden. Mit diesen Methoden wurden bereits Inzidenzstudien durchgeführt [128, 168-176].

Die Erhebungen von Inzidenzdaten sind in der Regel aufwendig, da umfassende und teure Verlaufsstudien in großen Kohorten erforderlich sind. Labormethoden, mit denen die Dauer der HIV-Infektion im Patienten eingegrenzt werden kann, sind aus epidemiologischer Sicht daher wertvoll, da sie Kohortenstudien teilweise ersetzen könnten.

4.1 Vergleichbarkeit der HIV-Inzidenz-Teste

Mit dem BED-ELISA und der Aviditäts-Methode wurden vergleichbare Sensitivitäten und Spezifitäten für die Bestimmung inzidenter Proben erhalten. Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität war das Referenzprobenpanel aus der Serokonverterstudie verwendet worden. Im Vergleich zu Literaturdaten waren die Sensitivität und Spezifität der beiden Inzidenz-Teste nicht signifikant verschieden. In der vorgelegten Studie lag die Sensitivität nur 2% niedriger (Sensitivität BED 80% RPP im Vergleich zu 82% bei Parekh *et al.* [109]). Die berechnete Spezifität lag 14% unter den publizierten Werten (Spezifität AI 74% RPP im Vergleich zu 88% bei Suligoi *et al.* [121]).

Auch für den zeitlichen Cut-Off wurde ein unterschiedlicher Wert im Vergleich zur Literatur anhand des RPP ermittelt.

Während Parekh *et al.* von 155 Tagen (22 Wochen) und Suligoi *et al.* von sechs Monaten (24 Wochen) berichten, so wurde in dieser Arbeit für das RPP in beiden Testen der Cut-Off für die bestmögliche Unterscheidung zwischen inzident und prävalent bei 20 Wochen ermittelt [111, 121, 177].

Das RKI beteiligte sich im Rahmen des von der EU geförderten Projektes „EuroHIV Work Package 7 on HIV Incidence“ an einer Validierung verschiedener Inzidenzteste. Dazu wurden Referenzproben und Proben von HIV-Erstdiagnosen ausgetauscht. Sie wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit in den Laboren von F. Barin und J. Parry sowie am RKI parallel im BED-ELISA gemessen. Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse ergab einen hohen Übereinstimmungsgrad von 97% (Stichprobengröße der vom RKI zur Verfügung gestellten Blutproben $n = 190$). Aufgrund dieser hohen Übereinstimmung und auch gestützt durch die gute Reproduzierbarkeit der publizierten Messwerte für das kommerzielle BBI-Probenpanel kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede in den beobachteten Sensitivitäten und Spezifitäten anderer Autoren nicht an der Durchführung der Methoden selbst liegen, sondern durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Probenpanels bzw. der Spenderpopulation bedingt ist.

Auswahl der Referenzprobenpanel

Bei der Auswahl des RPP des RKI wurden vier Kriterien festgelegt: alle Patienten waren therapie-naiv, nicht im AIDS-Stadium, hatten eine Subtyp-B-Infektion und waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme Antikörper-positiv.

Alle Proben mussten von therapie-naiven Patienten stammen, um auszuschließen, dass die Therapie bzw. die durch HAART gesenkte Viruslast einen Einfluss auf die Antikörperspiegel und damit auf die Testergebnisse haben könnte. Dieser Einfluss war in anderen HIV-Inzidenz-Studien beschrieben worden [101, 178].

In diesen Untersuchungen wurden Proben von langzeit-infizierten, therapierten HIV-Patienten als falsch-inzident bestimmt. Von Patienten im AIDS-Stadium ist bekannt, dass diagnostische HIV-Teste falsch-negative oder fragliche Ergebnisse liefern können, da aufgrund der fortgeschrittenen Immundefizienz nicht mehr genügend B-Zellen vorhanden sind, um die normale Antikörperproduktion aufrecht zu erhalten [179].

Es wurde zudem früh beschrieben, dass im BED-ELISA trotz konservierter Antigene in Abhängigkeit des Subtyps unterschiedliche Fensterphase vorliegen [180, 181]. Die Inzidenzteste können nur an bestätigt positiven Proben durchgeführt werden.

Die ausgewählten Patienten der Serokonverterstudie haben einen definierten Serokonversionszeitpunkt, der durch einen letzten negativen und einen ersten positiven Antikörper-Test eingrenzbar ist, die nicht weiter als drei Monate auseinander liegen dürfen. Alternativ wurde auch ein erstes reaktives Testdatum als Auswahlkriterium erlaubt, wenn zu diesem Zeitpunkt die Testergebnisse entweder virale RNA positiv und/oder Antikörperrnachweis fraglich vorlagen. Diese Patientenkatgorie wurde dann als „akute Serokonverter“ bezeichnet.

Das vierte Kriterium ist das wichtigste Kriterium, da es auch dazu dient, den Serokonversionszeitpunkt als beste Annäherung an den Infektionszeitpunkt zu berechnen. Durch dieses Einschlusskriterium konnte die Dauer der Infektion relativ genau bestimmt werden. Im RPP stammen 89% der Proben von akuten Serokonvertern. Außerdem deckt das RPP mit 64% der 148 Proben den Zeitraum des ersten Jahres der Infektion gut ab, in dem der Cut-Off zur Unterscheidung zwischen inzident und prävalent festgelegt wurde.

Probenpanels anderer Studien werden häufig mit weniger strikten Auswahlkriterien zusammengestellt. Suligoi *et al.* [121] haben zur Etablierung des Aviditäts-Indexes 216 Serum-Proben von 47 Patienten verwendet, die über einen dokumentierten negativen und einen ersten positiven HIV-Test im Abstand von maximal 24 Monaten verfügten. Da als Infektionszeitpunkt das arithmetische Mittel zwischen dem letzten negativen und dem ersten positiven Test genommen wurde, ist der Infektionszeitpunkt wesentlich ungenauer als bei dem hier verwendeten Referenzprobenpanel. Zwar hatten 27 der 47 Personen nur einen Abstand von weniger als sechs Monaten zwischen den beiden Testen, aber wie viele Proben von diesen Patienten verwendet wurden, ist nicht beschrieben. Insgesamt lagen nur 34 der 216 Proben unter sechs Monaten Infektionsdauer und weitere 30 Proben innerhalb des Zeitraumes von sechs bis zwölf Monaten. Das erste Jahr der Infektion, welches den kritischen Zeitraum zur Unterscheidung zwischen inzident und prävalent beinhaltet, wurde somit nur mit 28% des von Suligoi *et al.* [121] verwendeten Probenpanels abgedeckt.

Die meisten Proben des RP, die falsch klassifiziert wurden, stammten von Patienten, die eine Infektionsdauer zwischen sechs und zwölf Monaten hatten. Ähnliche Ergebnisse wurden 2008 bei einem Vergleich von vier verschiedenen Inzidenztesten erhalten.

Hier wurde gezeigt, dass die meisten der falsch-inzident klassifizierten Proben aus dem zweiten Halbjahr der Infektion stammten [180]. Wird dieser Zeitraum durch die Referenzproben nicht gut abgedeckt, ergeben sich verständlicherweise Diskrepanzen in den Sensitivitäten und Spezifitäten im Inzidenztest.

Das Probenpanel von Parekh *et al.* [109], die den BED-ELISA entwickelten, deckt diesen Zeitraum besser ab. 67 Proben stammen aus kommerziellen Serokonversions-Paneln, 37 Proben von bekannten inzidenten HIV-Fällen aus den USA und 518 Proben wurden von 90 Serokonvertern während einer longitudinalen Studie in Bangkok (Thailand) gesammelt. Hierbei wurden im ersten Jahr der Serokonversion im Durchschnitt im Abstand von 60 Tagen die Proben gesammelt. Insgesamt lag die Hälfte aller Proben ($n = 311$) dieses Panels unterhalb von 160 Tagen nach berechnetem Infektionszeitpunkt, und auch das zweite Jahr nach Infektion war anscheinend ausreichend repräsentiert [111].

Barin *et al.* [114] verwendeten ebenfalls ein gut charakterisiertes Panel aus 224 Proben von 81 Serokonvertern. Die Proben stammten von Patienten mit einer frischen HIV-Infektion, die durch ähnliche Kriterien wie beim in dieser Arbeit etablierten RPP gesichert waren (inkompletter WB oder positiver RNA-Nachweis bei negativem ELISA, oder nicht mehr als maximal sechs Monate Abstand zwischen dem letzten negativen ELISA und dem ersten positiven ELISA-Ergebnis). Bei diesem Panel lagen 118 Proben innerhalb der ersten 180 Tage der Infektion und waren damit inzident nach der publizierten Festlegung der Fensterphase des IDE-V3-ELISA [114].

Die Eingrenzung der Infektionsdauer, die dem in dieser Arbeit etablierten Probenpanels zugrunde liegt, ist im Vergleich zu den genannten Probenpaneln exakter möglich. Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Referenzpaneln, wird offenbar, dass die veröffentlichten Daten der Inzidenz-Teste nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind, da jeweils unterschiedliche Referenzpanels eingesetzt wurden. Ein Vergleich der Sensitivität und Spezifität der drei eingesetzten Testverfahren ist jedoch durch die Verwendung desselben Probenpanels sehr gut möglich.

Ein entscheidender Faktor bei der Vergleichbarkeit der Teste ist die unterschiedliche Fensterphase, die von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich definiert und vor allem unterschiedlich bestimmt wurde.

Eine Fensterphase bezeichnet üblicherweise in der Labordiagnostik das Zeitfenster zwischen dem Infektionszeitpunkt des Individuums und den erstmalig nachweisbaren Antikörpern der HIV-Infektion bzw. anderer diagnostischer Verlaufsparemeter.

Dieser Zeitpunkt ist von der Sensitivität der Testmethode abhängig.

Ob eine frische oder weiter zurückliegende Infektion vorliegt, kann mit Hilfe der eingesetzten Testverfahren mit einer relativ guten Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden, wenn nur ein Serum/Plasma für die Untersuchung zur Verfügung steht. Hierbei spielt die Festlegung des zeitlichen Cut-Offs (Unterscheidung frisch/alt) eine wesentliche Rolle. Diese Festlegung ist umso genauer, je enger die im Referenzpanel verwendeten Proben nach der Infektion gewonnen wurden und zusätzliche Verlaufspuren der Serokonverter innerhalb des ersten Jahres nach Infektion gewonnen wurden.

Die Unterschiede in der Zusammenstellung der Probenpanels und auch der Berechnung des vermuteten Infektionszeitpunktes der Probanden zwischen den verschiedenen Publikationen resultieren in unterschiedlichen Zeiträumen für die berechnete Fensterphase. Da anhand dieser Fensterphasen die Entscheidung zwischen inzident und prävalent gefällt wird, beeinflusst sie direkt die Sensitivität und Spezifität der Testverfahren.

Entscheidung für den Einsatz des BED-ELISA in den Studien

Die Sensitivität von 80% und die Spezifität von 86% des BED-ELISA lagen im Vergleich zur Aviditäts-Methode mit einer Sensitivität von 74% und einer Spezifität von 82% etwas höher, obwohl die Werte statistisch nicht signifikant verschieden waren. Die Entscheidung, den BED-ELISA in der Pilotstudie und der deutschlandweiten Studie einzusetzen, basierte aber auch auf dem besseren PreisLeistungsverhältnis und der Automaten-unabhängigen Durchführung.

Zwei Limitierungen des BED-ELISA sind bereits genannt worden. Eine Einschränkung ist, dass er trotz des subtyp-generischen (BED) Antigens viele Proben von Non-B-Subtyp-Infektionen falsch-inzident klassifiziert [180, 181]. Ursache dafür sind Subtyp-abhängige Fensterphasen [180]. In Ländern, in denen Non-B-Subtypen prävalent sind, sollte der BED-ELISA an einem repräsentativen Probenpanel validiert werden, um eventuell Korrekturfaktoren für die Fensterphase und damit den Cut-off zu ermitteln.

Für den HIV-1 Subtyp C wurde dies in einer Studie in Simbabwe bereits getan und eine etwas längere Fensterphase von 187 Tagen des BED-ELISA für diesen Subtyp berechnet [182].

Zum anderen ist bekannt, dass der BED-ELISA Proben von Patienten unter Therapie mit einer niedrigen Viruslast oder auch Proben von AIDS-Patienten mit einer CD4⁺-Zellzahl unter 200 häufig als falsch-inzident klassifiziert [183].

Diese beiden Limitierungen spielen für eine in Deutschland durchgeführte Inzidenzstudie keine große Rolle, da zum einen in Deutschland Subtyp-B-Infektionen dominieren und zum anderen nur HIV-Erstdiagnosen gemessen werden und auch das klinische Stadium der HIV-Infektion und der Therapiestatus dokumentiert wird. Dadurch würden sowohl ein AIDS-Stadium als auch therapierte Patienten erkannt werden. Ein weiteres Argument für den Einsatz des BED-ELISA in der Pilotstudie ist die Tatsache, dass er als einziger Test für HIV-Inzidenzstudien zugelassen ist.

4.2 Welche weiteren Faktoren können zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Inzidenzteste beitragen?

Im Vergleich zu diagnostischen HIV-Nachweisverfahren sind Sensitivitäten und Spezifitäten mit nur 80% relativ niedrig. Virale Determinanten und Wirtsfaktoren können die Ursache für eine zu gering ausgeprägte oder zu hohe Avidität bzw. für zu niedrige oder zu hohe HIV-IgG-Antikörper-Spiegel sein.

Daher wurden einige Wirtsfaktoren und virale Eigenschaften von Patienten mit falsch-klassifizierten Proben im Vergleich zu den richtig-klassifizierten Proben untersucht, um Parameter zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität der Inzidenzteste haben und als Ansatzpunkt zu ihrer Verbesserung eingesetzt werden könnten.

Im BED-ELISA wurden insgesamt 25 von 148 Proben falsch bestimmt (12 falsch-prävalent und 13 falsch-inzident), während in der Aviditäts-Methode 32 Proben falsch bestimmt wurden (17 falsch-prävalent, 15 falsch-inzident).

Aufgrund des limitierten Probenmaterials wurden 28 Proben aus dem Panel ausgewählt, die aus je sieben Proben der vier unterschiedlichen Reaktionskategorien bestanden (falsch oder richtig-inzident; falsch oder richtig-prävalent). Bei der Auswahl der richtig bestimmten Proben wurde darauf geachtet, dass jeweils die Infektionsdauer der Patienten bis zur Probennahme zu den ausgewählten falsch-bestimmten Proben vergleichbar war. Bei diesem 28er Referenzset stand genügend Material zur Verfügung, so dass alle Untersuchungen an ihm durchgeführt wurden.

Für zwei Untersuchungen (Neutralisierende Antikörper und IgG-Gesamtgehalt) wurde die Hälfte des RPP getestet. Diese 74 Proben enthielten ebenfalls immer die 28 Proben. Die Einteilung in die vier verschiedenen Reaktionskategorien für das 28er Referenzset wurde für die alle anderen Untersuchungen der Einfachheit halber übernommen.

CD4⁺-Zellzahl und Viruslast

Die CD4⁺-T-Zellzahl und die Viruslast lagen für 63 von 81 Patienten vor. Die Höhe der CD4⁺-Zellzahl ist bei HIV-Infizierten ein Marker für den Zustand des Immunsystems. Da HIV nur CD4⁺-Zellen infizieren kann, ist eine niedrige CD4⁺-Zellzahl (< 400/μl) im Patienten meist mit einem Anstieg der Viruslast im Blut korreliert. Gerade für die CD4⁺-Zellzahl könnte man einen Zusammenhang erwarten, da eine niedrige CD4⁺-Zellzahl eine Schwächung des Immunsystems anzeigt und davon der Titer an HIV-spezifischen Antikörpern betroffen sein kann.

Es konnte jedoch keine auffällige Korrelation zwischen der Höhe der Viruslast bzw. CD4⁺-Zellzahl und einer Fehl-Klassifizierung festgestellt werden. Dass weder die CD4⁺-Zellzahl noch die Viruslast einen Einfluss auf die Avidität der Antikörper hat, ist auch in der Literatur beschrieben [121, 129].

Allerdings wurden die Viruslast und CD4⁺-Zellzahl nicht immer aus der Blutentnahme bestimmt, die auch für den Inzidenztest verwendet wurde, da diese Labordaten von den einsendenden Ärzten abgefragt wurden.

Ein zeitlicher Abstand von ein paar Wochen könnte in Bezug auf die Höhe der CD4⁺-Zellzahl und Viruslast einen Unterschied ausmachen [62], der die Korrelation beeinflusst.

Neutralisierende Antikörper, IgG-Gesamtgehalt und IgG-Subklassen

Auch für den IgG-Gesamtgehalt und den Titer an neutralisierenden Antikörpern, die jeweils in 50% (74 Proben) des RPP gemessen wurden, konnte keine Korrelation mit den Inzidenz-ELISA-Ergebnissen festgestellt werden.

Damit wurde die These, dass ein hoher Anteil an HIV-spezifischen IgG-Antikörpern oder besonders aviden Antikörpern mit einem hohen IgG-Gesamtgehalt oder einem hohen Titer an neutralisierenden HIV-Antikörpern korreliert, nicht bestätigt. Allerdings wurden in dem Neutralisationstest nicht die autologen Viren der Patienten, sondern ein Laborstamm als zu neutralisierendes Antigen verwendet.

Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Aktivität der neutralisierenden Antikörper gegenüber den autologen Viren der jeweiligen Patienten differiert. Es wurde gezeigt, dass Patienten innerhalb der ersten 39 Monate einer HIV-Infektion neutralisierende Antikörper gegen autologe Viren bilden, während gegen Laborstämme der Titer an neutralisierenden Antikörpern oft zeitlich versetzt auftrat und niedriger war [184].

Die IgG-Subklassen dagegen unterschieden sich im IgG3-Gehalt in den 28 Proben gruppenspezifisch. Der IgG3-Gehalt der falsch-inzident gemessenen Proben war signifikant niedriger als der in richtig-prävalent bestimmten Proben. Auch nach der Überprüfung des gesamten RPP blieb der Unterschied signifikant.

Der niedrigere IgG3-Gehalt der zwölf falsch-inzident bestimmten Proben gegenüber den richtig-prävalent bestimmten Proben könnte ein Hinweis auf einen zeitlich verzögerten Subklassen-Switch in den Patienten mit falsch-inzident bestimmten Proben sein, und einen Ansatzpunkt für eine verbesserte Detektion von richtig-inzidenten Proben darstellen. Direkt konnte mit dieser zusätzlichen Information jedoch keine Verbesserung erzielt werden, da sich die falsch-inzident bestimmten Proben zwar aufgrund des niedrigen IgG3-Gehaltes von den richtig-prävalenten Proben, jedoch nicht von den richtig-inzident bestimmten Proben abgrenzen ließen. Für die verschiedenen Reaktionskategorien wurden auch einige Unterschiede in anderen Subklassen, IgG1 und IgG2, beobachtet, wenn auch (noch) nicht signifikant. Wilson *et al.* [120] setzten bereits die spezifischen Anti-p24-IgG3 Antikörper zur Unterscheidung zwischen inzidenten und prävalenten Proben ein. Eine Feindifferenzierung der IgG-Subklassen könnte demnach zur Verbesserung der Inzidenzteste beitragen.

Antikörper gegen env gp41

In Western Blot-Analysen der 28 Proben zeigte sich, dass von fast allen Patienten aller vier Reaktionsgruppen gegen zwei Antigene, gp160/120 und p24, Antikörper gebildet wurden, während die Antikörperantwort für die anderen HIV-Antigene sehr heterogen war. Die gp160 Bande ist das Env-Vorläuferprotein aus gp120 und gp41. Der Einfluss des chaotropen Agens auf die Antikörperbindung an das gp160 und gp120 war vergleichbar mit den Ergebnissen der AI-Methode und somit eine Bestätigung dieser Methode. Antikörper gegen das Kapsidprotein p24 waren ebenfalls in fast allen Proben enthalten.

Mit dem WB-AI für das p24 war ebenfalls keine Unterscheidung der inzidenten Proben von den anderen Proben möglich. Für eine bessere Detektion inzidenter Proben könnte jedoch die Abwesenheit von Antikörpern gegen die Integrase (p31) in der Gruppe der frisch Infizierten ein weiteres Unterscheidungsmerkmal darstellen. Hier zeigten nur zwei der sieben Proben eine p31 Bande, während in den anderen Gruppen jeweils sechs von sieben Proben eine Reaktivität gegen p31 zeigten. Solch unterschiedliche Antikörperprofile nutzt die von Schüppbach *et al.* (2005) entwickelte Methode zur Inzidenztestung [118].

Bei dieser Methode wird die Antikörperantwort gegen verschiedene Antigene von HIV anhand des Bandenmusters und der Intensität der einzelnen Banden bewertet und mit einem Algorithmus, bei dem die Intensitäten dieser Antikörperantworten aufsummiert werden und anhand eines Grenzwertes zwischen inzident und prävalent entschieden.

Ein Peptid-ELISA mit überlappenden Peptiden des gp41 wurde zur Überprüfung der Antikörperreaktivitäten in den Proben des gut charakterisierten RPP eingesetzt. Das antigene Epitop, das im BED-ELISA eingesetzt wird, ist schon lange als immundominantes Epitop charakterisiert [185]. Diese Region des Transmembranproteins zeigte wie erwartet die höchste Reaktivität im Peptid-ELISA. Darüber hinaus konnten keine auffälligen Antikörperantworten identifiziert werden, die mit einer Fehl-Klassifizierung korrelierten.

Virale *env* gp41 Varianten

In 99% aller Patienten wird gegen das virale *env*-gp41 eine Antikörperantwort induziert [186] und der immundominante Bereich des gp41 wird im BED-ELISA als Antigen verwendet [113]. Daher wurde das virale gp41 aus den 28 ausgewählten Proben des RPP amplifiziert und sequenziert, um Sequenzvarianten in der immundominanten Region im gp41 zwischen den vier Reaktionsgruppen identifizieren zu können.

Eine Überprüfung der viralen *env*-gp41 Sequenzen ließ die für *env* charakteristischen inter-Patient Divergenzen von 12-17% erkennen [164, 165]. Es konnten keine virus-spezifischen Besonderheiten im *env* gp41 identifiziert werden, die eine Erklärung für falsch-inzidente bzw. falsch-prävalente Antikörperreaktivitäten ergaben.

Unter allen geprüften viralen und Wirtsdeterminanten bietet ausschließlich die Feindifferenzierung der HIV-1 spezifischen IgG-Subklassen einen Ansatzpunkt, mit dem die Inzidenzteste in ihrer Spezifität eventuell verbessert werden könnten.

4.3 Einsatz Filter-getrockneter Plasmaproben für Antikörper- und Genomnachweis in Studien

Die Verwendung von Filter-getrocknetem Probenmaterial bietet viele Vorteile in Studien, da der Versand und die Lagerung der Proben sich vereinfachen.

In einer Reihe von Studien wurden bereits Filterproben aus Plasma, Serum oder EDTA-Blut für Untersuchungen der HIV-Antikörper, der proviralen DNA und der viralen RNA eingesetzt [130-132, 167, 173, 187]. Die Aussagen hinsichtlich der erforderlichen Lagerungstemperaturen für den RNA-Nachweis unterschieden sich jedoch [132, 167].

Das wichtigste Argument für die Verwendung von Filterproben ist der deutlich günstigere und unkompliziertere Versand des Probenmaterials. Wenn für eine deutschlandweite Inzidenzstudie EDTA-Blut eingesetzt werden sollte, müsste jede Patientenprobe von einem besonderen Kurierdienst innerhalb von 24 Stunden an das RKI geschickt werden,

wie dies in der HIV-Serokonverterstudie organisiert ist [69]. Die Proben müssen nach Erhalt sofort aufgearbeitet und das gewonnene Serum/Plasma asserviert werden. Dies ist sehr kosten- und arbeitsaufwendig. Je nach Untersuchungsmaterial und geplanter Analytik können Filterproben hingegen über einen gewissen Zeitraum gesammelt werden und sachgerecht verpackt per Post an das RKI geschickt werden. Dies ist wesentlich kostengünstiger. Die Lagerung ist ebenfalls einfacher, da eine Filterkarte im Vergleich zu Probenröhrchen weniger Lagerplatz benötigt.

Auch für das Handling der Proben im Labor stellen Filterproben eine Vereinfachung dar, da hierbei nicht infektiöses Material weiterverarbeitet wird. Aus diesen Gründen war die Frage, inwieweit die serologische Inzidenztestung auch aus Filterproben durchführbar ist, im Vorfeld der Planung einer deutschlandweiten Inzidenzstudie sehr wesentlich.

Durch die Untersuchung der Infektiosität von HIV-Filterproben in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HIV durch die Trocknung auf Filter inaktiviert wird. Dies ist ein Grund, warum Filterkarten in besonderen Umverpackungen mit der Post geschickt werden können und keinen besonderen Kurierdienst benötigen.

Zur Validierung des BED-ELISA aus Filter-getrocknetem Material wurden von Probenplasma 30µl auf Filter getropft, da dies ungefähr einem Blutstropfen aus der Fingerbeere entspricht. Ausgehend von dieser Probenmenge waren zuvor in der Arbeitsgruppe verschiedene andere serologische Tests aus Filtern etabliert worden und in verschiedenen Studien eingesetzt worden [188-190].

Zur Durchführung des BED-ELISA wurden die Filter in 450µl Probenpuffer eluiert. Dies entspricht einer 1:15 Probenverdünnung, die bei bestätigt HIV-positiven Serum/Plasmaproben keine Einschränkung der Testsicherheit bewirkte.

Es konnte mit dem RPP gezeigt werden, dass der BED-ELISA sehr gut mit den Filtereluaten durchführbar ist, vorausgesetzt die Kalibratoren werden in gleicher Weise prozessiert. Der IDE-V3 lieferte sogar eine bessere Sensitivität mit Filter-getrockneten Proben. Für diesen Test könnte demnach eine Vorverdünnung der Plasmaproben die Sensitivität und Spezifität in der regulären Durchführung eventuell verbessern.

Ein Nachteil von Filterproben ist, dass Standard-HIV-Diagnostik und Genomnachweis nicht oder nur mit eingeschränkter Sensitivität möglich sind. So wurden in den weitergehenden Untersuchungen in dieser Arbeit festgestellt, dass für eine Untersuchung der viralen RNA aus Filterproben diese bei mindestens -20°C gelagert werden müssen. Durch die Trocknung und Lagerung der Proben kommt es zu einem Sensitivitätsverlust in der Viruslastbestimmung.

Da man durch die Elution aus den Filtern zwangsläufig eine Probenverdünnung einführt, können zudem schwach positive Antikörperproben von Patienten, die sich in der Serokonversion befinden, falsch-negativ werden. Für serologische Individualdiagnostik sind Filter-getrocknete Proben im Hinblick auf negative Untersuchungsergebnisse nicht einsetzbar. Genomnachweise können ebenfalls nur mit reduzierter Nachweisgrenze aufgrund des limitierten Ausgangsvolumens, das getropft wird, durchgeführt werden.

In Inzidenzstudien kann der BED-ELISA aus Filter-getrockneten Plasmaproben jedoch ohne Einschränkung eingesetzt werden, vorausgesetzt die Kalibratoren werden in geeigneter Weise eingesetzt.

4.4 HIV-Pilot-Inzidenzstudie in Berlin

Seit der Erfassung der HIV-Diagnosen in Deutschland erreichten die Fallzahlen den niedrigsten Stand im Jahr 2001 mit deutschlandweit 1443 gemeldeten Fällen. Seitdem gab es einen Anstieg um 80% auf 2638 neu gemeldete Fälle im Jahr 2006. In Jahr 2006 wurden 389 neu diagnostizierte HIV-Fälle für Berlin gemeldet [5].

Früher wurde in Deutschland die HIV-Inzidenz durch Rückrechnung der gemeldeten AIDS-Fälle und den gesammelten Prävalenzdaten geschätzt, es gab also keine aktuell berechnete Inzidenzrate. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Pilotstudie sollte erstmalig eine Inzidenzrate für das Land Berlin berechnet werden und die Durchführbarkeit einer deutschlandweiten Inzidenzstudie eingeschätzt werden [150, 191].

Da anhand des RPP für den BED-ELISA eine Sensitivität und Spezifität von um die 80% berechnet wurde, wurde eine Adjustierung der Ergebnisse der Pilotstudie durchgeführt. Die in der Pilotstudie durchgeführte Adjustierung basiert auf der Annahme, dass sich das Studienkollektiv im BED-ELISA ähnlich dem Referenzprobenpanel verhalten wird. Da über die HIV-Inzidenz in Deutschland keine anderen Daten zur HIV-Inzidenz vorhanden sind, ist dies die einzige Möglichkeit einer Adjustierung. Für eine nationale HIV-Inzidenz-Studie könnte man berechtigterweise kritisieren, dass das RPP nicht der durchschnittlichen Population der HIV-Infizierten in Deutschland entspricht und es dadurch eventuell zu einer Verzerrung der Ergebnisse durch eine solche Adjustierung kommen könnte. In dem Fall der HIV-Inzidenz-Pilotstudie für Berlin war die Studienpopulation dem RPP sehr ähnlich, weswegen die Annahme, dass sich das Studienkollektiv ähnlich dem RPP verhalten wird, gerechtfertigt scheint.

In der Pilotstudie wurde ein adjustierter Anteil inzidenter Infektionen von 50,9% in dem Studienkollektiv ermittelt. Für die Gruppe der MSM lag der Anteil inzidenter Infektionen bei 54,4% und für die anderen Risikogruppen bei 16,1%. Diese Zahlen liegen im internationalen Vergleich hoch. Eine Studie in Österreich ermittelte einen Inzidenzanteil von 27,3% unter neu diagnostizierten Patienten zwischen Januar 2002 und Oktober 2003 [128]. In Frankreich wurde insgesamt ein Anteil von 24,9% und 46% nur für MSM in dem Zeitraum Januar 2003 bis März 2005 beobachtet [115]. In der Schweiz wurden 36% inzidenter HIV-Infektionen in neu diagnostizierten Patienten während eines einjährigen Beobachtungszeitraumes festgestellt [119].

Im Raum Berlin wurden insgesamt in der Sammlungsperiode der Studie 495 HIV-Erstdiagnosen dem RKI gemeldet. Mit 26% aller Erstdiagnosen ($n = 132$) ist diese Pilotstudie für den gesamten Raum Berlin fast repräsentativ. Unter den 132 Patienten der Studie waren Frauen, Personen aus HPL und Männern mit heterosexuellen Kontakt deutlich unterrepräsentiert, während die Gruppe der MSM mit 90% gegenüber 77% unter den gemeldeten Erstdiagnosen signifikant überrepräsentiert war. Ein Vergleich der Altersgruppenverteilung der Patienten in der Inzidenzstudie mit den gemeldeten Erstdiagnosen, nur auf die Gruppe der MSM bezogen, zeigte eine signifikante Übereinstimmung zwischen den gemeldeten Erstdiagnosen und dieser Studie, so dass die Daten aus der Pilotstudie für die 119 untersuchten MSM repräsentativ für MSM in Berlin sind.

Der Selektionsbias hinsichtlich der Transmissionsgruppen ist durch die Rekrutierung der Patienten erklärbar. Die sehr gute Zusammenarbeit mit Berliner Ärzten und dem RKI im Rahmen der Serokonverterstudie führte dazu, dass viele Patienten gleichzeitig an der Serokonverterstudie und der Inzidenzstudie teilnahmen, da sie die Einschlusskriterien beider Studien erfüllten. Dies wiederum führte zu einem überproportionalen Anteil an MSM, da sich diese Risikogruppe häufiger testen lässt und der Anteil an frischen Infektionen unter den neu-diagnostizierten Patienten hoch liegt. Auch ist die Gruppe der MSM Studien gegenüber häufig aufgeschlossener. Der Anteil der inzidenten Infektionen war besonders hoch in der Altersgruppe von 20 bis 29 Jahren [150].

Das besondere Testverhalten der MSM und der schon erwähnte Selektionsbias durch die Serokonverterstudie erklärt möglicherweise den in der Studie gefundenen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl früherer HIV-Teste und einem inzidenten BED-ELISA Ergebnis.

Das alarmierende Ergebnis dieser Studie ist die beobachtete höhere Inzidenzrate bei jungen MSM. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung der Ergebnisse einer anderen epidemiologischer Studie zu „knowledge, behavior and attitude“ (KABaSTI). In dieser Studie wurden über Internetportale speziell die Gruppe der MSM befragt [189]. Die Ergebnisse zeigten, dass gerade die Gruppe der MSM auf der einen Seite gut aufgeklärt sind, jedoch die Angst vor einer HIV-Infektion gerade unter jungen MSM stark nachgelassen hat.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die gute Selbsteinschätzung der Patienten bezüglich des vermuteten Infektionszeitpunktes, obwohl nur bei 30% der Patienten eine Serokonversionssymptomatik vorlag. Diese Ergebnisse der HIV Pilot-Inzidenzstudie legen nahe, dass ein großer Teil der Patienten mit frischer HIV-Diagnose den Zeitraum unter Risiko, in dem die Infektion erfolgte, sehr gut einschätzen kann. Es kann aber auch gefolgert werden, dass Personen mit stark ausgeprägtem Risikobewusstsein eine frühe Diagnosestellung anstreben. Aus dem signifikanten Zusammenhang zwischen akuter Serokonversionssymptomatik und dem labordiagnostischen Nachweis einer frischen HIV-Infektion ist zu vermuten, dass das Auftreten einer akuten klinischen Symptomatik im Rahmen der Serokonversion ein begünstigender Faktor für eine frühe Diagnose darstellt.

Die gewonnenen Daten und Ergebnisse lassen eine bundesweite Folgestudie im Rahmen der nationalen HIV-Surveillance als sinnvoll erscheinen.

Zu erwartende Ergebnisse sind für die Präventionsmaßnahmen von Bedeutung und betreffen unter anderem folgende Bereiche:

- Datenerhebung bei aktuell infizierten bzw. exponierten Personengruppen
- Zeitnah zum Infektionszeitpunkt erfasste Risiken bzw. Risikoverhalten (jedoch zukünftig HIV-negative Kontrollgruppe erforderlich)
- Infektiosität während der primären HIV-Infektion deutlich erhöht
- Identifizierung von Bevölkerungsgruppen mit verzögertem Diagnostik-Zugang
- Verknüpfung epidemiologischer und sozial-wissenschaftlicher Daten (KAB- oder „second Generation“ Surveillance)

Das Bundesministerium für Gesundheit unterstützt nach Beurteilung der Ergebnisse der Pilotstudie jetzt eine dreijährige bundesweite Folgestudie, die im Januar 2008 angelaufen ist und voraussichtlich im Juni 2010 endet. In dieser Studie wurden insbesondere während der Pilotphase gewonnene, operationale Erfahrungen berücksichtigt und bei der Planung und Durchführung umgesetzt.

Aus den beobachteten Selektionsbias ergab sich die Konsequenz, die Blutproben nicht über klinische Zentren oder Schwerpunktpraxen zu gewinnen, sondern über die Diagnostiklabore, in denen die HIV-Diagnose gestellt wird. In einem zweiten Studienarm werden dagegen soziodemographische, klinische und KAB-Daten gewonnen, wobei dazu mit klinischen Behandlern in sechs Sentinel-Gebieten in Deutschland kooperiert wird.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Inzidenzbestimmung am RKI etabliert und validiert. Eine der beiden Methoden, der BED-ELISA wurde für die Auswertung der Berliner HIV-Inzidenz-Pilotstudie eingesetzt. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der angeborenen Variabilität der Immunantwort die hier ermittelten Werte zur Sensitivität und Spezifität der Testverfahren von etwa 80% nahe an dem Limit sind, welches man von einer serologischen Methode zur Erkennung von inzidenten Infektionen erwarten kann [111]. Sicherlich gibt es aber Möglichkeiten, aufgrund zusätzlicher Parameter die Aussagen zur Inzidenz zu verbessern. Ein Ansatzpunkt könnte die in dieser Arbeit identifizierte Häufung von niedrigen IgG3-Antikörperspiegeln im Plasma falsch-inzidenter Probanden sein.

Der Grund für die ca. 20% Patientenproben, welche zu hohe (12 von 148 falsch-prävalent im BED-ELISA) oder zu niedrige (13 von 148 falsch-inzident im BED-ELISA) HIV-spezifische Antikörpertiter oder zu gering (15 von 148 falsch-inzident im AI) oder zu hoch (17 von 148 falsch-prävalent im AI) avide Antikörper entwickeln, ist nach allen bisherigen Hinweisen nicht von den infizierenden Viren abhängig.

Die Antikörperreifung durch somatische Hypermutation sowie der Subklassen-Switch der IgG-Antikörper sind Prozesse, die von den genetischen Veranlagungen des Individuums abhängig sind. Durch Untersuchungen der Wirtsgenome großer Kohorten HIV-Infizierter könnten bestimmte HLA-Muster oder andere genetische Marker für die angeborene oder adaptive Immunantwort identifiziert werden, welche zu einer solch unterschiedlichen Antikörperentwicklung führen.

Solche Daten könnten im Rahmen von großen Studien, wie zum Beispiel der zurzeit laufenden Internationalen HIV-Kontroller-Studie (<http://www.hivcontrollers.org>), gewonnen werden.

Das Ziel der Kontroller-Studie ist, herauszufinden, warum manche Patienten ihre HIV-Infektion ohne Medikamente unter Kontrolle halten können. Die Hoffnung ist, über diese Studie neue Hinweise zur Entwicklung verbesserter Medikamente oder eines Impfstoffes zu erhalten.

Die Kohorte der „HIV-Kontroller“ soll vor allen Dingen mit den neuen technischen Möglichkeiten der Ganz-Genom-Sequenzierung im Rahmen von „Genome-wide association studies“ (GWAS) untersucht werden [192, 193]. Im Rahmen solcher Untersuchungen könnte eine Antwort auf die unterschiedliche Antikörperentwicklung der Patienten herausgefunden werden.

An den Ergebnissen dieser Arbeit und auch an den bisher veröffentlichten Daten zu den verschiedenen Inzidenztesten wird deutlich, dass eine Sensitivität und Spezifität von 80% bzw. 86% für eine individuelle Diagnostik nicht ausreicht. Eine solche individuelle Diagnose über die Dauer der Infektion wäre jedoch für den Patienten von Vorteil, wenn dadurch die Therapie besser angepasst werden könnte. Die genaue Kenntnis des Infektionszeitraumes im Vorfeld von Studien zum geeigneten Therapiebeginn sind wichtig, um eine Aussage über die Wirkung einer frühen Therapie treffen zu können.

Die Bestimmung der Inzidenzrate innerhalb einer Population ist vor allem für die epidemiologische Überwachung sehr wichtig. Hiermit kann sowohl das aktuelle Transmissionsgeschehen der Epidemie überwacht, als auch die Präventionsarbeit bewertet und gegebenenfalls an veränderte Verhaltensweisen der Risikogruppen angepasst werden. Für die Bestimmung der Inzidenz ist sowohl eine möglichst hohe Spezifität als auch Sensitivität des Testes sehr wichtig. Für eine möglichst sichere Identifizierung von inzidenten Infektionen ist eine hohe Spezifität wichtig.

Für den IDE-V3 ELISA wurde anhand des RPP eine Spezifität von 99% bei einem Cut-Off von 0,5 ermittelt. Dies ging aber zu Lasten der Sensitivität (40%). Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis einer Vergleichsuntersuchung von vier Inzidenztesten in Afrika, in denen der IDE-V3 ebenfalls die höchste Spezifität (96%) bei einer geringen Sensitivität von 42% aufwies [180]. Im BED-ELISA kann jedoch durch eine Herabsetzung des Cut-Offs auf 0,5 ODn die Spezifität ebenfalls auf 92% bei einer gleichzeitigen Sensitivität von 70% erhöht werden. Dies führt zu einem erheblich höheren Anteil an sicher inzident identifizierten Patienten.

Durch eine parallele Bestimmung des Inzidenzanteils und einer gleichzeitigen Patientenbefragung, in der Daten zu Wissen, Einstellung und Verhalten abgefragt werden, wie in der Pilotstudie angewandt, erhält man gute Korrelationen.

Diese Datensätze gesichert inzidenter Patienten können gesondert ausgewertet und so die Risikogruppen identifiziert werden, in denen die Neuinfektionen stattfinden.

Die Inzidenz in einer Bevölkerung oder in bestimmten Risikogruppen festzustellen ist nicht nur für Surveillance und Prävention wichtig. Um eine aussagekräftige Impfstoffstudie durchführen zu können, muss man die Inzidenzrate kennen, um die erforderliche Größe der Studiengruppen bestimmen zu können. Daher sollte jeder Impfstoffstudie eine Inzidenz-Studie vorgeschaltet sein [97].

Ist die vorhergesagte Inzidenzrate zu hoch, so ist in einer Impfstoffstudie die Zahl der serokonvertierten Individuen in der nicht geimpften Gruppe zu klein, um ein belastbares Ergebnis erwarten zu können. So wurden zum Beispiel 2006 zwei Studien zu Microbiziden abgebrochen, da die erwartete Inzidenzrate von 5% und 4% zu hoch lagen gegenüber der während der Studien aktuell beobachteten Inzidenzraten von 2% [94]. Selbst kleine Unterschiede zwischen vorhergesagter und tatsächlicher Inzidenz können einen großen Effekt auf die Aussagekraft einer Impfstoffstudie haben. Wenn eine Inzidenzrate von 5% vorhergesagt ist, und die tatsächliche Inzidenzrate nur 4% beträgt, so muss die Anzahl der Studienteilnehmer für die Sicherheit der statistischen Aussage um 25% erhöht werden [97]. Ein grundsätzliches Problem von Inzidenzstudien bleibt jedoch immer bestehen. Sobald man in eine Population hineingeht, um die Inzidenz zu bestimmen, beeinflusst man die Inzidenzrate selbst [97].

Durch die in dieser Arbeit etablierten und validierten Methoden könnten die sehr aufwendigen und teuren longitudinalen Verlaufsstudien durch eine „Single-Sample“-Teststrategie zumindest teilweise ersetzt werden. Dies hätte zusätzlich den Vorteil, dass eine solche Studie relativ schnell durchgeführt werden könnte und nicht über mehrere Jahre hinweg laufen müsste.

Die zusätzliche Möglichkeit der Nutzung Filter-getrockneter Proben für die serologischen Inzidenzuntersuchungen ist auch ein großer Vorteil für die Durchführung solcher Studien in Entwicklungsländern, in denen eine durchgehende Kühlkette oft nicht gewährleistet ist.

Durch diese Arbeit wurde gezeigt, dass Inzidenzstudien anhand serologischer Tests durchführbar sind. Diese Arbeit schafft die Voraussetzung für die im Januar 2008 begonnene deutschlandweite Inzidenzstudie, die mit Filterproben durchgeführt wird. Die Ergebnisse der nationalen Studie sollen dazu beitragen, die Prävention präziser auf die Risikogruppen einzustellen, damit der derzeit zu beobachtenden Zunahme der neu diagnostizierten HIV-Infektionen in bestimmten Risikogruppen schnellstmöglich Einhalt geboten wird.

5 Literaturangaben

1. Gallo, R.C., P.S. Sarin, E.P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V.S. Kalyanaraman, D. Mann, G.D. Sidhu, R.E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic, *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 865-7.
2. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.
3. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos-Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. 233(4761): p. 343-6.
4. UNAIDS, *2008 Report on the global AIDS epidemic*. 2008.
5. Robert Koch Institut (2008): *HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland. Aktuelle epidemiologische Daten (Stand vom 01.03.2008) [HIV infections and AIDS disease in Germany. Epidemiological update]. Halbjahresbericht II/2007 aus dem Robert Koch Institut*. Epidemiologisches Bulletin 2008. Sonderausgabe A / 2008.
6. Rous, P., *A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., Experimental Medicine for Sept. 1, 1910, vol. 12, pp.696-705*. J Exp Med, 1979. 150(4): p. 738-53.
7. Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants and S. Wain-Hobson, *Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1*. Nature, 1990. 345(6273): p. 356-9.
8. Van Heuverswyn, F., Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B.F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E.M. Ngolle, P.M. Sharp, G.M. Shaw, E. Delaporte, B.H. Hahn and M. Peeters, *Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas*. Nature, 2006. 444(7116): p. 164.
9. Gao, F., E. Bailes, D.L. Robertson, Y. Chen, C.M. Rodenburg, S.F. Michael, L.B. Cummins, L.O. Arthur, M. Peeters, G.M. Shaw, P.M. Sharp and B.H. Hahn, *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. 397(6718): p. 436-41.
10. Hahn, B.H., G.M. Shaw, K.M. De Cock and P.M. Sharp, *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. 287(5453): p. 607-14.
11. Hemelaar, J., E. Gouws, P.D. Ghys and S. Osmanov, *Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004*. Aids, 2006. 20(16): p. W13-23.
12. Taylor, B.S., M.E. Sobieszczyk, F.E. McCutchan and S.M. Hammer, *The challenge of HIV-1 subtype diversity*. N Engl J Med, 2008. 358(15): p. 1590-602.
13. Zekeng, L., L. Gurtler, E. Afane Ze, A. Sam-Abbenyi, G. Mbouni-Essomba, E. Mpoudi-Ngolle, M. Monny-Lobe, J.B. Tapka and L. Kaptue, *Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: preliminary results*. Aids, 1994. 8(11): p. 1626-8.
14. Gurtler, L.G., L. Zekeng, J.M. Tsague, A. van Brunn, E. Afane Ze, J. Eberle and L. Kaptue, *HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV*. Arch Virol Suppl, 1996. 11: p. 195-202.
15. Simon, F., P. Mauclore, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M.C. Muller-Trutwin, S. Saragosti, M.C. Georges-Courbot, F. Barre-Sinoussi and F. Brun-Vezinet, *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O*. Nat Med, 1998. 4(9): p. 1032-7.
16. Ayoub, A., S. Souquieres, B. Njinku, P.M. Martin, M.C. Muller-Trutwin, P. Roques, F. Barre-Sinoussi, P. Mauclore, F. Simon and E. Nerrienet, *HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon*. Aids, 2000. 14(16): p. 2623-5.
17. Archer, J. and D.L. Robertson, *Understanding the diversification of HIV-1 groups M and O*. Aids, 2007. 21(13): p. 1693-700.
18. Kiwanuka, N., O. Laeyendecker, M. Robb, G. Kigozi, M. Arroyo, F. McCutchan, L.A. Eller, M. Eller, F. Makumbi, D. Birx, F. Wabwire-Mangen, D. Serwadda, N.K. Sewankambo, T.C. Quinn, M. Wawer and R. Gray, *Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2008. 197(5): p. 707-13.
19. Gelderblom, H.R., *Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function*. Aids, 1991. 5(6): p. 617-37.
20. Dalgleish, A.G., P.C. Beverley, P.R. Clapham, D.H. Crawford, M.F. Greaves and R.A. Weiss, *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. 312(5996): p. 763-7.

21. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J.C. Gluckman and L. Montagnier, *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. 312(5996): p. 767-8.
22. Banda, N.K., J. Bernier, D.K. Kurahara, R. Kurrle, N. Haigwood, R.P. Sekaly and T.H. Finkel, *Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis*. J Exp Med, 1992. 176(4): p. 1099-106.
23. Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. McDougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss and R. Axel, *The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain*. Cell, 1986. 47(3): p. 333-48.
24. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman and N.R. Landau, *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. 381(6584): p. 661-6.
25. Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman and R.W. Doms, *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. 85(7): p. 1149-58.
26. Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore and W.A. Paxton, *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. 381(6584): p. 667-73.
27. Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy and E.A. Berger, *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. 272(5263): p. 872-7.
28. Fenyo, E.M., L. Morfeldt-Manson, F. Chiodi, B. Lind, A. von Gegerfelt, J. Albert, E. Olausson and B. Asjo, *Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates*. J Virol, 1988. 62(11): p. 4414-9.
29. Tersmette, M., R.E. de Goede, B.J. Al, I.N. Winkel, R.A. Gruters, H.T. Cuypers, H.G. Huisman and F. Miedema, *Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex*. J Virol, 1988. 62(6): p. 2026-32.
30. Doms, R.W. and S.C. Peiper, *Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry*. Virology, 1997. 235(2): p. 179-90.
31. Shang, L., L. Yue and E. Hunter, *Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection*. J Virol, 2008. 82(11): p. 5417-28.
32. Bukrinsky, M.I., N. Sharova, T.L. McDonald, T. Pushkarskaya, W.G. Tarpley and M. Stevenson, *Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(13): p. 6125-9.
33. Bowerman, B., P.O. Brown, J.M. Bishop and H.E. Varmus, *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA*. Genes Dev, 1989. 3(4): p. 469-78.
34. Farnet, C.M. and W.A. Haseltine, *Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex*. J Virol, 1991. 65(4): p. 1910-5.
35. Stremlau, M., C.M. Owens, M.J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier and J. Sodroski, *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. 427(6977): p. 848-53.
36. van Manen, D., M.A. Rits, C. Beugeling, K. van Dort, H. Schuitemaker and N.A. Kootstra, *The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection*. PLoS Pathog, 2008. 4(2): p. e18.
37. Ganesh, L., E. Burstein, A. Guha-Niyogi, M.K. Louder, J.R. Mascola, L.W. Klomp, C. Wijmenga, C.S. Duckett and G.J. Nabel, *The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes*. Nature, 2003. 426(6968): p. 853-7.
38. Chiu, Y.L., V.B. Soros, J.F. Kreisberg, K. Stopak, W. Yonemoto and W.C. Greene, *Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells*. Nature, 2005. 435(7038): p. 108-14.
39. Chiu, Y.L. and W.C. Greene, *APOBEC3 cytidine deaminases: distinct antiviral actions along the retroviral life cycle*. J Biol Chem, 2006. 281(13): p. 8309-12.
40. Preston, B.D., B.J. Poiesz and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1988. 242(4882): p. 1168-71.
41. Perelson, A.S., A.U. Neumann, M. Markowitz, J.M. Leonard and D.D. Ho, *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. 271(5255): p. 1582-6.

42. Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky and S. Wain-Hobson, *HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989. 2(4): p. 344-52.
43. Zack, J.A., S.J. Arrigo, S.R. Weitsman, A.S. Go, A. Haislip and I.S. Chen, *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. Cell, 1990. 61(2): p. 213-22.
44. Arlen, P.A., D.G. Brooks, L.Y. Gao, D. Vatakis, H.J. Brown and J.A. Zack, *Rapid expression of human immunodeficiency virus following activation of latently infected cells*. J Virol, 2006. 80(3): p. 1599-603.
45. Chun, T.W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J.A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T.C. Quinn, Y.H. Kuo, R. Brookmeyer, M.A. Zeiger, P. Barditch-Crovo and R.F. Siliciano, *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. Nature, 1997. 387(6629): p. 183-8.
46. Chun, T.W., D.C. Nickle, J.S. Justement, D. Large, A. Semerjian, M.E. Curlin, M.A. O'Shea, C.W. Hallahan, M. Daucher, D.J. Ward, S. Moir, J.I. Mullins, C. Kovacs and A.S. Fauci, *HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir*. J Clin Invest, 2005. 115(11): p. 3250-5.
47. Hutter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Mussig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kucherer, O. Blau, I.W. Blau, W.K. Hofmann and E. Thiel, *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2009. 360(7): p. 692-8.
48. Neumann, M., J. Harrison, M. Saltarelli, E. Hadziyannis, V. Erfle, B.K. Felber and G.N. Pavlakis, *Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. 10(11): p. 1531-42.
49. Berkowitz, R.D. and S.P. Goff, *Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein*. Virology, 1994. 202(1): p. 233-46.
50. Dorfman, T., F. Mammano, W.A. Haseltine and H.G. Gottlinger, *Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein*. J Virol, 1994. 68(3): p. 1689-96.
51. Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T.H. Lee and M. Essex, *The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions*. J Virol, 1992. 66(8): p. 4966-71.
52. Franke, E.K., H.E. Yuan and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature, 1994. 372(6504): p. 359-62.
53. Arthur, L.O., J.W. Bess, Jr., R.C. Sowder, 2nd, R.E. Benveniste, D.L. Mann, J.C. Chermann and L.E. Henderson, *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. 258(5090): p. 1935-8.
54. Gelderblom, H.R., E.H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli and M.A. Koch, *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins*. Virology, 1987. 156(1): p. 171-6.
55. Kinoshita, T., A. Tsujimoto and K. Shimotohno, *Sequence variations in LTR and env regions of HTLV-I do not discriminate between the virus from patients with HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia*. Int J Cancer, 1991. 47(4): p. 491-5.
56. De Clercq, E., *The design of drugs for HIV and HCV*. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(12): p. 1001-18.
57. Schacker, T., A.C. Collier, J. Hughes, T. Shea and L. Corey, *Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection*. Ann Intern Med, 1996. 125(4): p. 257-64.
58. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. N Engl J Med, 1998. 339(1): p. 33-9.
59. Fiebig, E.W., D.J. Wright, B.D. Rawal, P.E. Garrett, R.T. Schumacher, L. Peddada, C. Heldebrant, R. Smith, A. Conrad, S.H. Kleinman and M.P. Busch, *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. Aids, 2003. 17(13): p. 1871-9.
60. He, B., X. Qiao, P.J. Klasse, A. Chiu, A. Chadburn, D.M. Knowles, J.P. Moore and A. Cerutti, *HIV-1 Envelope Triggers Polyclonal Ig Class Switch Recombination through a CD40-Independent Mechanism Involving BAFF and C-Type Lectin Receptors*. J Immunol, 2006. 176(7): p. 3931-41.
61. Burton, D.R., *A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(19): p. 10018-23.
62. Mellors, J.W., L.A. Kingsley, C.R. Rinaldo, Jr., J.A. Todd, B.S. Hoo, R.P. Kokka and P. Gupta, *Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion*. Ann Intern Med, 1995. 122(8): p. 573-9.

63. De Clercq, E., *Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV*. Int J Antimicrob Agents, 2008.
64. Hogg, R.S., B. Yip, K.J. Chan, E. Wood, K.J. Craib, M.V. O'Shaughnessy and J.S. Montaner, *Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy*. Jama, 2001. 286(20): p. 2568-77.
65. Egger, M., M. May, G. Chene, A.N. Phillips, B. Ledergerber, F. Dabis, D. Costagliola, A. D'Arminio Monforte, F. de Wolf, P. Reiss, J.D. Lundgren, A.C. Justice, S. Staszewski, C. Leport, R.S. Hogg, C.A. Sabin, M.J. Gill, B. Salzberger and J.A. Sterne, *Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies*. Lancet, 2002. 360(9327): p. 119-29.
66. Palella, F.J., Jr., M. Deloria-Knoll, J.S. Chmiel, A.C. Moorman, K.C. Wood, A.E. Greenberg and S.D. Holmberg, *Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata*. Ann Intern Med, 2003. 138(8): p. 620-6.
67. DAIG, *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion*. 2008.
68. Gallant, J.E., *When to start antiretroviral therapy: a swinging pendulum?* Top HIV Med, 2008. 16(2): p. 82-8.
69. Poggensee, G., C. Kucherer, J. Werning, S. Somogyi, B. Bieniek, S. Dupke, H. Jessen and O. Hamouda, *Impact of transmission of drug-resistant HIV on the course of infection and the treatment success. Data from the German HIV-1 Seroconverter Study*. HIV Med, 2007. 8(8): p. 511-9.
70. Doyle, C. and J.L. Strominger, *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. Nature, 1987. 330(6145): p. 256-9.
71. Rouse, B.T., S. Norley and S. Martin, *Antiviral cytotoxic T lymphocyte induction and vaccination*. Rev Infect Dis, 1988. 10(1): p. 16-33.
72. Braciale, T.J., L.A. Morrison, M.T. Sweetser, J. Sambrook, M.J. Gething and V.L. Braciale, *Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes*. Immunol Rev, 1987. 98: p. 95-114.
73. Reimann, K.A., K. Tenner-Racz, P. Racz, D.C. Montefiori, Y. Yasutomi, W. Lin, B.J. Ransil and N.L. Letvin, *Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques*. J Virol, 1994. 68(4): p. 2362-70.
74. Yasutomi, Y., K.A. Reimann, C.I. Lord, M.D. Miller and N.L. Letvin, *Simian immunodeficiency virus-specific CD8+ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys*. J Virol, 1993. 67(3): p. 1707-11.
75. Borrow, P., H. Lewicki, B.H. Hahn, G.M. Shaw and M.B. Oldstone, *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. 68(9): p. 6103-10.
76. Koup, R.A., J.T. Safrit, Y. Cao, C.A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing and D.D. Ho, *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. J Virol, 1994. 68(7): p. 4650-5.
77. Safrit, J.T., C.A. Andrews, T. Zhu, D.D. Ho and R.A. Koup, *Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope*. J Exp Med, 1994. 179(2): p. 463-72.
78. Hadida, F., A. Parrot, M.P. Kieny, B. Sadat-Sowti, C. Mayaud, P. Debre and B. Autran, *Carboxyl-terminal and central regions of human immunodeficiency virus-1 NEF recognized by cytotoxic T lymphocytes from lymphoid organs. An in vitro limiting dilution analysis*. J Clin Invest, 1992. 89(1): p. 53-60.
79. Jassoy, C., R.P. Johnson, B.A. Navia, J. Worth and B.D. Walker, *Detection of a vigorous HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in cerebrospinal fluid from infected persons with AIDS dementia complex*. J Immunol, 1992. 149(9): p. 3113-9.
80. Plata, F., B. Autran, L.P. Martins, S. Wain-Hobson, M. Raphael, C. Mayaud, M. Denis, J.M. Guillon and P. Debre, *AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders*. Nature, 1987. 328(6128): p. 348-51.
81. Walker, B.D. and F. Plata, *Cytotoxic T lymphocytes against HIV*. Aids, 1990. 4(3): p. 177-84.
82. Riviere, Y., *Virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients infected with the human immunodeficiency virus, HIV-1*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1994. 40 Suppl 1: p. 45-8.
83. Frahm, N., K. Yusim, T.J. Suscovich, S. Adams, J. Sidney, P. Hrabar, H.S. Hewitt, C.H. Linde, D.G. Kavanagh, T. Woodberry, L.M. Henry, K. Faircloth, J. Listgarten, C. Kadie, N. Jojic, K. Sango, N.V. Brown, E. Pae, M.T. Zaman, F. Bihl, A. Khatri, M. John, S. Mallal, F.M. Marincola, B.D. Walker, A. Sette, D. Heckerman, B.T. Korber and C. Brander, *Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes*. Eur J Immunol, 2007. 37(9): p. 2419-33.

84. Cocchi, F., A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo and P. Lusso, *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. Science, 1995. 270(5243): p. 1811-5.
85. Baier, M., A. Werner, N. Bannert, K. Metzner and R. Kurth, *HIV suppression by interleukin-16*. Nature, 1995. 378(6557): p. 563.
86. Klein, M.R. and F. Miedema, *Long-term survivors of HIV-1 infection*. Trends Microbiol, 1995. 3(10): p. 386-91.
87. Cavacini, L.A., D. Kuhrt, M. Duval, K. Mayer and M.R. Posner, *Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. 19(9): p. 785-92.
88. Moore, J.P., Q.J. Sattentau and P.R. Clapham, *Enhancement of soluble CD4-mediated HIV neutralization and gp 120 binding by CD4 autoantibodies and monoclonal antibodies*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1990. 6(11): p. 1273-9.
89. Robert-Guroff, M., M. Brown and R.C. Gallo, *HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex*. Nature, 1985. 316(6023): p. 72-4.
90. Weiss, R.A., P.R. Clapham, R. Cheingsong-Popov, A.G. Dalgleish, C.A. Carne, I.V. Weller and R.S. Tedder, *Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients*. Nature, 1985. 316(6023): p. 69-72.
91. Wei, X., J.M. Decker, S. Wang, H. Hui, J.C. Kappes, X. Wu, J.F. Salazar-Gonzalez, M.G. Salazar, J.M. Kilby, M.S. Saag, N.L. Komarova, M.A. Nowak, B.H. Hahn, P.D. Kwong and G.M. Shaw, *Antibody neutralization and escape by HIV-1*. Nature, 2003. 422(6929): p. 307-12.
92. Becker, N.G., L.F. Watson and J.B. Carlin, *A method of non-parametric back-projection and its application to AIDS data*. Stat Med, 1991. 10(10): p. 1527-42.
93. Dietz, K., J. Seydel and B. Schwartlander, *Back-projection of German AIDS data using information on dates of tests*. Stat Med, 1994. 13(19-20): p. 1991-2008.
94. Kresge, J., *Advisory panel considers complexities of HIV prevention trials*. IAVI Report, 2007. 11/Number 1(January-February 2007): p. 14-16.
95. Peterman, T.A., *Can we get people to participate in a study of sexual behavior?* Sex Transm Dis, 1995. 22(3): p. 164-8.
96. Welz, T., V. Hosegood, S. Jaffar, J. Batzing-Feigenbaum, K. Herbst and M.L. Newell, *Continued very high prevalence of HIV infection in rural KwaZulu-Natal, South Africa: a population-based longitudinal study*. Aids, 2007. 21(11): p. 1467-1472.
97. Kresge, J., *Establishing accurate estimates of HIV incidence rates are critical to the success of prevention trials*. IAVI Report, 2007. 11/number3(May-June 2007): p. 1-7.
98. Brookmeyer, R., T. Quinn, M. Shepherd, S. Mehendale, J. Rodrigues and R. Bollinger, *The AIDS epidemic in India: a new method for estimating current human immunodeficiency virus (HIV) incidence rates*. Am J Epidemiol, 1995. 142(7): p. 709-13.
99. Brookmeyer, R. and T.C. Quinn, *Estimation of current human immunodeficiency virus incidence rates from a cross-sectional survey using early diagnostic tests*. Am J Epidemiol, 1995. 141(2): p. 166-72.
100. Pilcher, C.D., M.A. Price, I.F. Hoffman, S. Galvin, F.E. Martinson, P.N. Kazembe, J.J. Eron, W.C. Miller, S.A. Fiscus and M.S. Cohen, *Frequent detection of acute primary HIV infection in men in Malawi*. Aids, 2004. 18(3): p. 517-24.
101. Janssen, R.S., Satten, G.A., Stramer, S.L., Rawal, B.D., O'Brien, T.R., Weiblen, B.J., Hecht, F.M., Jack, N., Cleghorn, F.R., Kahn, J.O., Chesney, M.A., Busch, M.P., *New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes*. JAMA, 1998. 280: p. 42-48.
102. Rawal, B.D., A. Degula, L. Lebedeva, R.S. Janssen, F.M. Hecht, H.W. Sheppard and M.P. Busch, *Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. 33(3): p. 349-55.
103. Gouws, E., B.G. Williams, H.W. Sheppard, B. Enge and S.A. Karim, *High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. 29(5): p. 531-5.
104. McFarland, W., M.P. Busch, T.A. Kellogg, B.D. Rawal, G.A. Satten, M.H. Katz, J. Dilley and R.S. Janssen, *Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a sensitive/less-sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in San Francisco*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. 22(5): p. 484-9.
105. Machado, D.M., E.L. Delwart, R.S. Diaz, C.F. de Oliveira, K. Alves, B.D. Rawal, M. Sullivan, M. Gwinn, K.A. Clark and M.P. Busch, *Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV-1 to recently infected blood donors*. Aids, 2002. 16(1): p. 113-9.

106. Dukers, N.H., H.S. Fennema, E.M. van der Snoek, A. Krol, R.B. Geskus, M. Pospiech, S. Jurriaans, W.I. van der Meijden, R.A. Coutinho and M. Prins, *HIV incidence and HIV testing behavior in men who have sex with men: using three incidence sources, The Netherlands, 1984-2005*. *Aids*, 2007. 21(4): p. 491-9.
107. Fisher, M., D. Pao, G. Murphy, G. Dean, D. McElborough, G. Homer and J.V. Parry, *Serological testing algorithm shows rising HIV incidence in a UK cohort of men who have sex with men: 10 years application*. *Aids*, 2007. 21(17): p. 2309-14.
108. Schwarcz, S., T. Kellogg, W. McFarland, B. Louie, R. Kohn, M. Busch, M. Katz, G. Bolan, J. Klausner and H. Weinstock, *Differences in the temporal trends of HIV seroincidence and seroprevalence among sexually transmitted disease clinic patients, 1989-1998: application of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion*. *Am J Epidemiol*, 2001. 153(10): p. 925-34.
109. Parekh, B.S., D.J. Hu, S. Vanichseni, G.A. Satten, D. Candal, N.L. Young, D. Kitayaporn, L.O. Srisuwanvilai, S. Rakhtam, R. Janssen, K. Choopanya and T.D. Mastro, *Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand*, in *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001. p. 453-8.
110. Parekh, B.S., C.P. Pau, M.S. Kennedy, T.L. Dobbs and J.S. McDougal, *Assessment of antibody assays for identifying and distinguishing recent from long-term HIV type 1 infection*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(2): p. 137-46.
111. Parekh, B.S., M.S. Kennedy, T. Dobbs, C.P. Pau, R. Byers, T. Green, D.J. Hu, S. Vanichseni, N.L. Young, K. Choopanya, T.D. Mastro and J.S. McDougal, *Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002. 18(4): p. 295-307.
112. Dobbs, T., S. Kennedy, C.P. Pau, J.S. McDougal and B.S. Parekh, *Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion*. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(6): p. 2623-8.
113. Calypte, *Package insert of Calypte® HIV-1 BED Incidence EIA (IgG-Capture HIV-EIA)*. 2008.
114. Barin, F., L. Meyer, R. Lancar, C. Deveau, M. Gharib, A. Laporte, J.C. Desenclos and D. Costagliola, *Development and validation of an immunoassay for identification of recent human immunodeficiency virus type 1 infections and its use on dried serum spots*. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(9): p. 4441-7.
115. Semaille, C., F. Barin, F. Cazein, J. Pillonel, F. Lot, D. Brand, J.C. Plantier, P. Bernillon, S. Le Vu, R. Pinget and J.C. Desenclos, *Monitoring the Dynamics of the HIV Epidemic Using Assays for Recent Infection and Serotyping among New HIV Diagnoses: Experience after 2 Years in France*. *J Infect Dis*, 2007. 196(3): p. 377-83.
116. Pollet, D.E., E.L. Saman, D.C. Peeters, H.M. Warmenbol, L.M. Heyndrickx, C.J. Wouters, G. Beelaert, G. van der Groen and H. Van Heuverswyn, *Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus 1 and 2 with a strip-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides*. *Clin Chem*, 1991. 37(10 Pt 1): p. 1700-7.
117. Walther, L., P. Putkonen, F. Dias, G. Biberfeld and R. Thorstensson, *Evaluation of HIV-1/HIV-2 immunoblots for detection of HIV-2 antibodies*. *Clin Diagn Virol*, 1995. 4(1): p. 67-79.
118. Schubach, J., M.D. Gebhardt, Z. Tomasik, C. Niederhauser, S. Yerly, P. Burgisser, L. Matter, M. Gorgievski, R. Dubs, D. Schultze, I. Steffen, C. Andreutti, G. Martinetti, B. Guntert, R. Staub, S. Daneel and P. Vernazza, *Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation*. *PLoS Med*, 2007. 4(12): p. e343.
119. Gebhardt M, D.S., Vernazza P, Schüpbach J, Werner M, Staub R, and B. K, *Intensivierte epidemiologische Surveillance von HIV-Erstdiagnosen in der Schweiz [Intensified epidemiological surveillance of HIV case detection in Switzerland]*. *Eur J Med Res* 2007. 12 (Supp II): 1.
120. Wilson, K.M., E.I. Johnson, H.A. Croom, K.M. Richards, L. Doughty, P.H. Cunningham, B.E. Kemp, B.M. Branson and E.M. Dax, *Incidence immunoassay for distinguishing recent from established HIV-1 infection in therapy-naïve populations*. *Aids*, 2004. 18(17): p. 2253-9.
121. Suligoi, B., Galli, C., Massi, M., Di Sora, F., Sciandra, M., Pezzotti, P., Recchia, O., Montella, F., Sinicco, A., Rezza, G., *Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method*. *J Clin Microbiol*, 2002. 40: p. 4015-4020.
122. Eggers, M., U. Bader and G. Enders, *Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy*. *J Med Virol*, 2000. 60(3): p. 324-30.

123. Jenum, P.A., B. Stray-Pedersen and A.G. Gundersen, *Improved diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity*. J Clin Microbiol, 1997. 35(8): p. 1972-7.
124. Matter, L., K. Kogelschatz and D. Germann, *Serum levels of rubella virus antibodies indicating immunity: response to vaccination of subjects with low or undetectable antibody concentrations*. J Infect Dis, 1997. 175(4): p. 749-55.
125. Kneitz, R.H., J. Schubert, F. Tollmann, W. Zens, K. Hedman and B. Weissbrich, *A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid*. BMC Infect Dis, 2004. 4: p. 33.
126. Ward, K.N., D.J. Turner, X.C. Parada and A.D. Thiruchelvam, *Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections*. J Clin Microbiol, 2001. 39(3): p. 959-63.
127. Suligoi, B., M. Massi, C. Galli, M. Sciandra, F. Di Sora, P. Pezzotti, O. Recchia, F. Montella, A. Sinicco and G. Rezza, *Identifying recent HIV infections using the avidity index and an automated enzyme immunoassay*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. 32(4): p. 424-8.
128. Puchhammer-Stockl, E., B. Schmied, A. Rieger, M. Sarcletti, M. Geit, R. Zangerle and H. Hofmann, *Low proportion of recent human immunodeficiency virus (HIV) infections among newly diagnosed cases of HIV infection as shown by the presence of HIV-specific antibodies of low avidity*. J Clin Microbiol, 2005. 43(1): p. 497-8.
129. Martro, E., B. Suligoi, V. Gonzalez, V. Bossi, A. Esteve, J. Mei and V. Ausina, *Comparison of the avidity index method and the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion, two methods using a single serum sample for identification of recent HIV infections*. J Clin Microbiol, 2005. 43(12): p. 6197-9.
130. Parker, S.P. and W.D. Cubitt, *The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies*. J Clin Pathol, 1999. 52(9): p. 633-9.
131. Luo, W., H. Yang, K. Rathbun, C.P. Pau and C.Y. Ou, *Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay*. J Clin Microbiol, 2005. 43(4): p. 1851-7.
132. Sherman, G.G., G. Stevens, S.A. Jones, P. Horsfield and W.S. Stevens, *Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. 38(5): p. 615-7.
133. Salter, R.D., D.N. Howell and P. Cresswell, *Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids*. Immunogenetics, 1985. 21(3): p. 235-46.
134. Means, R.E., T. Greenough and R.C. Desrosiers, *Neutralization sensitivity of cell culture-passaged simian immunodeficiency virus*. J Virol, 1997. 71(10): p. 7895-902.
135. Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell and R. Nairn, *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. 36(1): p. 59-74.
136. DuBridge, R.B., P. Tang, H.C. Hsia, P.M. Leong, J.H. Miller and M.P. Calos, *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. 7(1): p. 379-87.
137. Salahuddin, S.Z., P.D. Markham, F. Wong-Staal, G. Franchini, V.S. Kalyanaraman and R.C. Gallo, *Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes*. Virology, 1983. 129(1): p. 51-64.
138. Adachi, A., H.E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson and M.A. Martin, *Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone*. J Virol, 1986. 59(2): p. 284-91.
139. Duwe, S., M. Brunn, D. Altmann, O. Hamouda, B. Schmidt, H. Walter, G. Pauli and C. Kucherer, *Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naïve patients of the German Seroconverter Study*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. 26(3): p. 266-73.
140. Kuecherer, C., L. Schuenadel, S. Somogyi, B. Bartmeyer, O. Hamouda, G.s.s. group and H.A.c. net, *Transmission and persistence of HIV-1 with thymidine analogue resistance mutations in HIV-1 infected patients with documented date of infection*. sixth European HIV Drug Resistance Workshop Abstract book, 2008.
141. Trkola, A., *AALTO HIV-1 p24 ANTIGEN ELISA, Devised by Dr. A. Trkola, based on the method developed by Dr. John Moore*. 2006.
142. Helwig, M., *Transport von HIV-1 durch epitheliale Zellen. Identifizierung einer neuen funktionalen Domäne auf gp120*. 2006.
143. van Kuppeveld, F.J., K.E. Johansson, J.M. Galama, J. Kissing, G. Bolske, J.T. van der Logt and W.J. Melchers, *Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR*. Appl Environ Microbiol, 1994. 60(1): p. 149-52.
144. Pieniazek, D., C. Yang and R. Lal, *Phylogenetic Analysis of gp41 Envelope of HIV-1 G M, N, and O*. The Human Retroviruses and AIDS 1998 Compendium, 1998: p. 112-117.

145. Walter, H., B. Schmidt, K. Korn, A.M. Vandamme, T. Harrer and K. Uberla, *Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors*. J Clin Virol, 1999. 13(1-2): p. 71-80.
146. Sambrook J.; Fritsch EF, M.T., *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. . 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
147. Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
148. Gray, J., *Assays for virus infection*. 1999.
149. Harms, V., *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*. Harms Verlag, Kiel, 1992. p. 69.
150. Batzing-Feigenbaum, J., S. Loschen, S. Gohlke-Micknis, B. Hintsche, M. Rausch, H. Hillenbrand, C. Cordes, G. Poggensee, C. Kücherer and O. Hamouda, *Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007*. HIV Medicine (2009), 2009: p. 1 -10.
151. Fleiss, J., *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 1981. John Wiley & Sons, Second Edition: p. 23-24.
152. Abramowitz, M. and I. Stegun, *Handbook of Mathematical Functions*. 1972.
153. Cooke, D., A. Craven and G. Clarke, *Basic Statistical Computing*. 1990: p. pp. 84-85.
154. Eisen, H.N. and G.W. Siskind, *Variations In Affinities Of Antibodies During The Immune Response*. Biochemistry, 1964. 3: p. 996-1008.
155. Riou, M., G. Renier, S. Mattman, P. Fialaire, J. Loison, J.M. Chennebault and C. Payan, *[Dynamic study of anti-HIV antibody avidity after cellular immunity restoration under antiretroviral treatment]*. Ann Biol Clin (Paris), 2000. 58(6): p. 715-20.
156. Boston Biomedica, I., *HIV-1 INCIDENCE/PREVALENCE PERFORMANCE PANEL (PRB601) DATA SHEET*. 2004.
157. Rödiger, J., *Etablierung eines Aviditätsindex der Antigen-Antikörperbestimmung zur Differenzierung inzidenter und prävalenter HIV-Infektionen*. 2005.
158. van Opijnen, T. and B. Berkhout, *The host environment drives HIV-1 fitness*. Rev Med Virol, 2005. 15(4): p. 219-33.
159. Konstantinopoulos, P.A., B.J. Dezube, L. Pantanowitz, G.L. Horowitz and B.A. Beckwith, *Protein electrophoresis and immunoglobulin analysis in HIV-infected patients*. Am J Clin Pathol, 2007. 128(4): p. 596-603.
160. Thomas, L., *Labor und Diagnose* 1992(MVG, Marburg).
161. Broliden, P.A., L. Morfeldt-Mansson, J. Rosen, M. Jondal and B. Wahren, *Fine specificity of IgG subclass response to group antigens in HIV-1-infected patients*. Clin Exp Immunol, 1989. 76(2): p. 216-21.
162. Schauer, U., F. Stemberg, C.H. Rieger, M. Borte, S. Schubert, F. Riedel, U. Herz, H. Renz, M. Wick, H.D. Carr-Smith, A.R. Bradwell and W. Herzog, *IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents*. Clin Chem, 2003. 49(11): p. 1924-9.
163. Thomas, H.I.J., Wilson, S., O'Toole, C.M., Lister, C.M., Saeed, A.M., Watkins, R.P.F., Morgan-Capner, P., *Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1*. Clin. Exp. Immunol., 1996. 103: p. 185-191.
164. Li, W.H., M. Tanimura and P.M. Sharp, *Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences*. Mol Biol Evol, 1988. 5(4): p. 313-30.
165. Penn, O., A. Stern, N.D. Rubinstein, J. Dutheil, E. Bacharach, N. Galtier and T. Pupko, *Evolutionary modeling of rate shifts reveals specificity determinants in HIV-1 subtypes*. PLoS Comput Biol, 2008. 4(11): p. e1000214.
166. Pinkerton, S.D., *How many sexually-acquired HIV infections in the USA are due to acute-phase HIV transmission?* Aids, 2007. 21(12): p. 1625-9.
167. McNulty, A., C. Jennings, D. Bennett, J. Fitzgibbon, J.W. Bremer, M. Ussery, M.L. Kalish, W. Heneine and J.G. Garcia-Lerma, *Evaluation of Dried Blood Spots for HIV-1 Drug Resistance Testing*. J Clin Microbiol, 2006.
168. Pillonel, J., F. Barin, S. Laperche, P. Bernillon, S. Le Vu, S. Brunet, D. Thierry and J.C. Desenclos, *Human immunodeficiency virus type 1 incidence among blood donors in France, 1992 through 2006: use of an immunoassay to identify recent infections*. Transfusion, 2008.
169. Li, S.W., X.Y. Zhang, X.X. Li, M.J. Wang, D.L. Li, Y.H. Ruan, X.X. Zhang and Y.M. Shao, *Detection of recent HIV-1 infections among men who have sex with men in Beijing during 2005 - 2006*. Chin Med J (Engl), 2008. 121(12): p. 1105-8.
170. Hall, H.I., R. Song, P. Rhodes, J. Prejean, Q. An, L.M. Lee, J. Karon, R. Brookmeyer, E.H. Kaplan, M.T. McKenna and R.S. Janssen, *Estimation of HIV incidence in the United States*. Jama, 2008. 300(5): p. 520-9.

171. Barnighausen, T., C. Wallrauch, A. Welte, T.A. McWalter, N. Mbizana, J. Viljoen, N. Graham, F. Tanser, A. Puren and M.L. Newell, *HIV incidence in rural South Africa: comparison of estimates from longitudinal surveillance and cross-sectional cBED assay testing*. PLoS ONE, 2008. 3(11): p. e3640.
172. Wolday, D., H. Meles, E. Hailu, T. Messele, Y. Mengistu, M. Fekadu, B.S. Parekh and T. Wuhib, *Temporal trends in the incidence of HIV infection in antenatal clinic attendees in Addis Ababa, Ethiopia, 1995-2003*. J Intern Med, 2007. 261(2): p. 132-7.
173. Rehle, T., O. Shisana, V. Pillay, K. Zuma, A. Puren and W. Parker, *National HIV incidence measures - new insights into the South African epidemic*. S Afr Med J, 2007. 97(3): p. 194-9.
174. Jiang, Y., M. Wang, M. Ni, S. Duan, Y. Wang, J. Feng, Y. Xiao, Y. Dong, D. Wang, M. Han, L. Xiang, L. Ma and Q. Zhou, *HIV-1 incidence estimates using IgG-capture BED-enzyme immunoassay from surveillance sites of injection drug users in three cities of China*. Aids, 2007. 21 Suppl 8: p. S47-51.
175. Saphonn, V., B.S. Parekh, T. Dobbs, C. Mean, L.H. Bun, S.P. Ly, S. Heng and R. Detels, *Trends of HIV-1 seroincidence among HIV-1 sentinel surveillance groups in Cambodia, 1999-2002*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. 39(5): p. 587-92.
176. Suligoi, B., S. Butto, C. Galli, D. Bernasconi, R.A. Salata, L. Tavooschi, M. Chiappi, P. Mugenyi, F. Pimpinelli, C. Kityo, V. Regine and G. Rezza, *Detection of recent HIV infections in African individuals infected by HIV-1 non-B subtypes using HIV antibody avidity*. J Clin Virol, 2008.
177. Loschen, S., J. Batzing-Feigenbaum, G. Poggensee, C. Cordes, B. Hintsche, M. Rausch, S. Dupke, S. Gohlke-Micknis, J. Rodig, O. Hamouda and C. Kucherer, *Comparison of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1-Specific Immunoglobulin G Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the Avidity Index Method for Identification of Recent HIV Infections*. J Clin Microbiol, 2008. 46(1): p. 341-5.
178. Schwarcz, S.K., T.A. Kellogg, W. McFarland, B. Louie, J. Klausner, D.G. Withum and M.H. Katz, *Characterization of sexually transmitted disease clinic patients with recent human immunodeficiency virus infection*. J Infect Dis, 2002. 186(7): p. 1019-22.
179. Tang, J.W., B.C. Wong, E. Lam, V. Tai, N. Lee, C.S. Cockram and P.K. Chan, *Failure to confirm HIV infection in two end-stage HIV/AIDS patients using a popular commercial line immunoassay*. J Med Virol, 2008. 80(9): p. 1515-22.
180. Sakarovich, C., F. Rouet, G. Murphy, A.K. Minga, A. Alioum, F. Dabis, D. Costagliola, R. Salamon, J.V. Parry and F. Barin, *Do Tests Devised to Detect Recent HIV-1 Infection Provide Reliable Estimates of Incidence in Africa?* J Acquir Immune Defic Syndr, 2007. 45(1): p. 115-22.
181. UNAIDS Reference Group on estimates, m.a.p., *Statement on the use of the BED assay for the estimation of HIV-1 incidence for surveillance or epidemic monitoring*. Wkly Epidemiol Rec, 2006. 81(4): p. 40.
182. Hargrove, J.W., J.H. Humphrey, K. Mutasa, B.S. Parekh, J.S. McDougal, R. Ntozini, H. Chidawanyika, L.H. Moulton, B. Ward, K. Nathoo, P.J. Iliff and E. Kopp, *Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay*. Aids, 2008. 22(4): p. 511-8.
183. Hayashida, T., H. Gatanaga, J. Tanuma and S. Oka, *Effects of Low HIV Type 1 Load and Antiretroviral Treatment on IgG-Capture BED-Enzyme Immunoassay*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2008.
184. Richman, D.D., T. Wrin, S.J. Little and C.J. Petropoulos, *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 4144-9.
185. Joller-Jemelka, H.I., P.W. Joller, F. Muller, J. Schupbach and P.J. Grob, *Anti-HIV IgM antibody analysis during early manifestations of HIV infections*. Aids, 1987. 1(1): p. 45-7.
186. Cao, Y.Z., F. Valentine, S. Hojvat, J.P. Allain, P. Rubinstein, M. Mirabile, S. Czelusniak, M. Leuther, L. Baker and A.E. Friedman-Kien, *Detection of HIV antigen and specific antibodies to HIV core and envelope proteins in sera of patients with HIV infection*. Blood, 1987. 70(2): p. 575-8.
187. Amellal, B., C. Katlama and V. Calvez, *Evaluation of the use of dried spots and of different storage conditions of plasma for HIV-1 RNA quantification*. HIV Med, 2007. 8(6): p. 396-400.
188. Schmidt, A., M. Vogel, J. Rockstroh, D. Radun and S.G.o.S.R.F.f.H. C, *Risk factors for hepatitis C in HIV positive MSM. A preliminary evaluation of a case control study*. Eur J Med Res, 2007. 12 (Suppl. II):1.
189. Schmidt, A., *Sexuell übertragbare Infektionen: Ergebnisse der KABA/STI-Studie des RKI zu Wissen, Einstellungen und Verhalten von MSM*. Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch-Institut, 2007. 23/2007(23).

190. Radun, D., C. Weilandt, J. Eckert, G. Schüttler, J. Weid, C. Kuecherer and O. Hamouda, *Risk behaviour and knowledge about blood-borne infections among prisoners in Germany and their seroprevalence regarding Hepatitis B, Hepatitis C, and HIV - preliminary results of a cross-sectional Study*. Eur J Med Res, 2007. 12 (Suppl. II): 1.
191. Batzing-Feigenbaum, J., S. Loschen, S. Gohlke-Micknis, R. Zimmermann, A. Herrmann, O. Kamga Wambo, C. Kucherer and O. Hamouda, *Country-wide HIV incidence study complementing HIV surveillance in Germany*. Euro Surveill, 2008. 13(36).
192. Saez-Cirion, A., G. Pancino, M. Sinet, A. Venet and O. Lambotte, *HIV controllers: how do they tame the virus?* Trends Immunol, 2007. 28(12): p. 532-40.
193. Miura, T., M.A. Brockman, C.J. Brumme, Z.L. Brumme, J.M. Carlson, F. Pereyra, A. Trocha, M.M. Addo, B.L. Block, A.C. Rothchild, B.M. Baker, T. Flynn, A. Schneidewind, B. Li, Y.E. Wang, D. Heckerman, T.M. Allen and B.D. Walker, *Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes*. J Virol, 2008. 82(17): p. 8422-30.

Publikationen:

- Fechner, H., L. Suckau, J. Kurreck, I. Sipo, X. Wang, S. Pinkert, S. Loschen, J. Reikittke, S. Weger, D. Dekkers, R. Vetter, V.A. Erdmann, H.P. Schultheiss, M. Paul, J. Lamers and W. Poller, *Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban*. Gene Ther, 2007. 14(3): p. 211-8.
- Loschen, S., J. Batzing-Feigenbaum, G. Poggensee, C. Cordes, B. Hintsche, M. Rausch, S. Dupke, S. Gohlke-Micknis, J. Rodig, O. Hamouda and C. Kücherer, *Comparison of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1-Specific Immunoglobulin G Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the Avidity Index Method for Identification of Recent HIV Infections*. J Clin Microbiol, 2008. 46(1): p. 341-5.
- Batzing-Feigenbaum, J., S. Loschen, S. Gohlke-Micknis, R. Zimmermann, A. Herrmann, O. Kamga Wambo, C. Kücherer and O. Hamouda, *Country-wide HIV incidence study complementing HIV surveillance in Germany*. Euro Surveill, 2008. 13(36)
- Batzing-Feigenbaum, J., S. Loschen, S. Gohlke-Micknis, B. Hintsche, M. Rausch, H. Hillenbrand, C. Cordes, G. Poggensee, C. Kücherer and O. Hamouda, *Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007*. HIV Medicine (2009), 2009: p. 1 -10.

Vorträge:

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) Expert Meeting on Drug Related Infectious Diseases (DRID), Lissabon, 10.-11.10.2006: Loschen S, Rödig J, Jansen A, Poggensee G, Hamouda O, Kücherer C: *Evaluation of gp41-IgG capture immunoassay and avidity of antibodies for HIV incidence studies*
- Annecy Group Meeting, RKI, Berlin, 23.-24.10.2006: Loschen S: *Comparison of the BED-CEIA and the avidity based method for detection of recent HIV-infections*
- Virologisches Institutseminar, RKI, Berlin, 17.09.2007: Loschen S: *HIV-Inzidenz Pilotstudie: Nachweis rezenter HIV-1 Infektionen aus frischem und Filter getrocknetem Plasma*

Posterpräsentationen:

- Frühjahrstagung 2006 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, München, 15.-18.3.2006: Loschen S; Jansen A, Poggensee G; Hamouda O, Kücherer C: *Comparison of different methods for detecting incident HIV-1 infections by IgG capture immunoassay and avidity index*
- Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress 2007, Frankfurt, 27.-30.6.2007: Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Gohlke-Micknis S, Poggensee G, Jansen A, Hamouda O, Kücherer C: *Differentiation of recent and chronic HIV-infections from filter Dried-Plasma-Spots*
- 3rd European Congress of Virology, Nürnberg, 1.-5.9.2007: Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Hamouda O, Kücherer C: *Pilot HIV incidence study: Detection of recent HIV-1 infections from fresh and filter-dried plasma*
- Frühjahrstagung 2008 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 5.-8.3.2008: Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Hamouda O, Kücherer C *Individual differences of the antibody response to HIV-1 env gp41 leading to misclassification of incident HIV-infections*
- Frühjahrstagung 2009 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Leipzig, 18.-21.3.2009: Loschen S, Strohschein K, Wiethaus J, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C: *The use of filter-dried plasma spots for HIV-1 viral load determinations and drug resistance analysis. 19th Annual*
- 1. Deutsch-Österreichisch-Schweizerische AIDS-Kongress (SÖDAK), St. Gallen/Schweiz, 24.-27.6.2009 (angenommen): Loschen S, Strohschein K, Drewell C, Bätzing-Feigenbaum J, Zimmermann R, Hamouda O, Kücherer C: *Instability of HIV-1 antibodies in filter-dried plasma samples stored at room temperature: consequences for its use in incidence tests*

Danksagung

Ich möchte mich für die großartige Unterstützung bedanken bei:

Meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Dr. Kücherer für die Bereitstellung des Themas, für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, ihre Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, mich an ihrer wissenschaftlichen Erfahrung teilhaben zu lassen.

Bei Herrn Prof. Dr. Krüger für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie an der Humboldt Universität zu Berlin.

Bei Herrn Prof. Dr. Pauli für die anregenden Diskussionen und für seine Erfahrungsberichte, welche zur Qualität der Arbeit beitrugen.

Bei all den Ärzten und PatientenInnen, die an den Studien teilgenommen haben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie beim BMG für die Finanzierung der Pilotstudie und der nationalen Inzidenzstudie.

Bei Stephen Norley für die Zusammenarbeit bei der Messung der neutralisierenden Antikörper und die anregenden Diskussionen.

Bei Prof. Barin, in dessen Labor die IDE-V3 Messungen durchgeführt wurden.

Beim Team des Labor Dr. Berg, wo ich den AxSYM nutzen durfte.

In der AG P11 bei Sabrina, Hanno und Katrin, für die Geduld in meinen ersten Tagen und für all die Hilfe während der ganzen Zeit bei P11. Besonders bei Sabrina, die immer eine Aufmunterung parat hatte, wenn es mal nicht so gut lief.

Selbstverständlich auch bei den anderen (auch ehemaligen) Mitgliedern von P11 sowie den vielen StudentenInnen, DiplomandenInnen und studentischen Hilfskräften.

Hier besonders bei Kristin, Julia, Christopher und Maren.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus der Epidemiologie (FG34), besonders Gaby, Jörg, Sylvia und Ruth, mit denen die Zusammenarbeit viel Spaß gemacht hat und immer noch macht (weiter so!!!).

Auch bei den anderen Abteilungen ZBS1, FG15 und FG12 möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken; natürlich auch bei dem Sequenzierteam des RKI.

Bedanken möchte ich mich bei den Personen, die mich zeitlich am meisten auf der Arbeit aushalten mussten und die mir die Arbeit immer erträglich gemacht haben: meine Büro-Kolleginnen Janine und Maren (von früher) und die neue Besetzung Jule, Angelina und Kathrin.

Großer Dank an meine Familie, an Max und Renate und an meine Freunde, die immer zu mir gehalten haben.

Der allergrößte Dank aber gebührt Judith!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin bekannt.

Berlin, den 19.08.2009

(Stephan Loschen)